



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

Д-Р ДЕНИЦА ТОДОРОВА ЦАНЕВА-ДАМЯНОВА

**КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНО ПРОУЧВАНЕ ВЪРХУ
РАЗПРОСТРАНЕНИЕТО НА ВИРУСНИ ХЕПАТИТИ В И D В ОБЩА
ПОПУЛАЦИЯ И ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНИ ЧЕРНОДРОБНИ
ЗАБОЛЯВАНИЯ В СЕВЕРОИЗТОЧНА БЪЛГАРИЯ.
ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТ НА НВУ ПОСТВАКСИНАЛНИЯ ИМУНЕН
ОТГОВОР ПРИ ВАКСИНИРАНИ ЛИЦА**

АВТОРЕФЕРАТ

**ЗА ПРИСЪЖДАНЕ
НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

Научна специалност: Вирусология, шифър 01.06.13

Научен ръководител: Доц. д-р Лилия Иванова Иванова, д.м.

Официални рецензенти:

Проф. д-р Радка Младенова Аргирова, д.м.н.

Доц. д-р Любомира Николаева-Гломб, д.м.

Варна, 2019 г.

Дисертационният труд съдържа 221 страници и е онагледен с 95 таблици и 47 фигури. Библиографията включва 567 литературни източника, от които 29 на кирилица и 538 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на Катедрен съвет на Катедра „Микробиология и вирусология“ при Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна на 20.12.2018 г. и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

1. Проф. д-р Радка Младенова Аргирова, д.м.н.
2. Доц. д-р Любомира Николаева-Гломб, д.м.
3. Доц. д-р Петя Динкова Генова-Калу, д.м.
4. Проф. д-р Теменуга Стоева, д.м.
5. Доц. д-р Лилия Иванова, д.м.

Дисертантът работи като асистент в Катедра „Микробиология и вирусология“, Факултет по медицина, МУ – Варна, и ръководител на Вирусологична лаборатория в СМДЛ „Статус“ – Варна.

Настоящият труд е разработен в Катедра „Микробиология и Вирусология“ към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, и УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Експерименталната работа е извършена във Вирусологична лаборатория и Център по транслационна медицина и клетъчна терапия при УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, Вирусологична лаборатория при СМДЛ „Статус“ – Варна, както и НРЛ по хепатитни вируси към НЦЗПБ – София.

В процеса на работа получихме ценна методическа и практическа помощ от колегите, работещи в съответните звена.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на2019 г. от.....часа
..... на открито заседание на Научното жури.
Материалите по защитата са на разположение в библиотеката и на сайта на Медицински Университет-Варна <http://www.mu-varna.bg>.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
1. УВОД	7
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО. ХИПОТЕЗИ	7
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
3.1. Материали.	8
3.2. Методи на изследване	9
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	12
4.1. Дефиниране на разпространението на хепатит В вирусната инфекция в Североизточна България в случайно подбрана популация.....	12
4.2. Проучване на относителния дял и етиологичната връзка на HBV и HDV при пациенти с хронични чернодробни заболявания.....	25
4.2.1. Установяване на разпространението на серологичните маркери за хепатит В и D вирусна инфекция при пациенти с хронични чернодробни заболявания.....	25
4.2.2. Установяване на относителния дял на едновременно инфектираните с HBV и HDV пациенти с хронични чернодробни заболявания.....	34
4.2.3. Прилагане на молекулярно-биологични методи (Real-time PCR) за определяне вирусния товар на едновременно инфектираните (HBV и HDV) пациенти. Изследване на взаимодействието между двата вируса.....	37
4.3. Определяне на относителния дял на окултно HBV носителство в Североизточна България.....	48
4.3.1. Дефиниране на разпространението на HBsAg негативните, anti-HBc total Ab положителни лица в случайно подбрана популация с приложение на ELISA и CLIA...	48
4.3.2. Изследване на пациенти с различни хронични заболявания и данни за чернодробна дисфункция за окултно носителство на HBV в ELISA	51
4.3.3. Молекулярно-биологично изследване на пациенти с чернодробна дисфункция за окултно носителство на HBV в PCR	55
4.3.4. Сравнителен анализ и оценка на методите и резултатите, получени при изследване на лицата от случайно подбрана популация и пациентите с хронични заболявания и чернодробна дисфункция.....	67
4.4. Проучване продължителността на имунния отговор при ваксинирани за HBV лица в обща популация на възраст от 6 месеца до 20 години в Североизточна България.....	70
5. ИЗВОДИ, ПРЕПОРЪКИ И ПРИНОСИ.....	78
6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	81
7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА. УЧАСТИЕ В ПРОЕКТИ.....	82
8. УЧАСТИЕ В ПРОЕКТИ	82

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

На кирилица

АК – аминокиселина
ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
И РНК – информационна РНК
НРЛ – национална референтна лаборатория
НЦЗПБ – национален център по заразни и паразитни болести
РНК – рибонуклеинова киселина
СЗО (WHO) – световна здравна организация
СМДЛ – самостоятелна медико-диагностична лаборатория
УВЛ – ултравиолетово лъчение
УМБАЛ – университетска болница за активно лечение

На латиница

ALT – аланин аминотрансфераза
Anti-HBc Ab – тотални антитела срещу ядрения антиген на HBV
Anti-HBc IgM Ab – антитела от клас IgM срещу ядрения антиген на HBV
Anti-HBs – антитела срещу HBsAg
Anti-HCV Ab – антитела срещу хепатит С вирус
Anti-HDV Ab – антитела срещу HDV
Anti-HBe Ab – антитела срещу HBe антиген
AP – алкална фосфатаза

АРОВЕС – аполипопротеин В и РНК редактиращ и катализиращ полипептидоподобен ензим
AST – аспартат аминотрансфераза
BEA – система за лесна оценка на клиничната фаза на хепатит D
cccDNA – ковалентно затворена циркулярна ДНК
CD4+ – Т хелперни лимфоцити
CD8+ – Т цитотоксични лимфоцити
CDC – център за превенция и контрол на болестите САЩ
CID – вътрешни сърцевинни делеции
CLIA – хемилуминисцентен имуноензимен метод
CP – сърцевинен промотор
CTLs – цитотоксични Т-лимфоцити
DNBV – патешкия HBV
DNBV – хепатит В вирус открит в патици
EASL – европейска асоциация за изучаване на черен дроб
ELISA (EIA) – ензимно-свързан имуносорбентен тест
ER – ендоплазматичен ретикулум
FAH – фумарилацетоацетат хидролазна мишка
GGTP – гама-глутамил трансфераза
HAI – индекс на хистологична активност

HAV – хепатит А вирус
 HBcAg – ядрен HBV антиген
 HBeAg – хепатит В „е“ антиген
 HBsAg – повърхностен хепатит В антиген
 HBV DNA – хепатит В вирусна ДНК
 HBV – хепатит В вирус
 HCC – хепатоцелуларен карцином
 HCV – хепатитен С вирус
 HDAg – хепатит D антиген
 HDV RNA – хепатит D вирусна РНК
 HDV – хепатит D вирус
 HepaRG – човешка хепатоцелуларна клетъчна линия
 HepG2 – човешка хепатоцелуларна клетъчна линия
 HIV – човешки имунодефицитен вирус
 HLA – човешки левкоцитен фактор
 Huh7 – човешка хепатоцелуларна клетъчна линия
 IFN – интерферон
 JAKs – кинази
 LCR – лигазно верижна реакция
 LDH – лактат дехидрогеназа
 MAP – митоген-активирана протеин киназа
 METAVIR – система за оценка на чернодробно възпаление и фиброза
 МНС – главен комплекс на тъканна съвместимост
 mRNA – информационна РНК
 MVBs – мултивезикуларни телца
 NASBA – амплификация на базата на нуклеотидно секвениране
 NK killers – естествени клетки убийци
 NTCP – трансмембранен рецептор – натриев таурохолат котранспортиращ полипептид
 NUCs – нуклеозидни аналози
 OBI – окултна HBV инфекция
 ORFs – отворени рамки за четене
 PCR – полимеразна верижна реакция
 TAP – метод, проучващ връзките на един полимер с друг
 pgRNA – прегеномна РНК
 RAF – серин/треонин специфична протеин киназа
 RAS – протеин предаваща киназа
 rcDNA – релаксираната циркулярна частично двойна молекула ДНК
 Real-time PCR – полимеразна верижна реакция в реално време
 RIA – радиоимуноензимен метод
 RT – PCR – ретротранскриптазна полимеразна верижна реакция
 sg RNA – субгеномна РНК
 Src – тирозин киназа
 STAT – сигнален транзюсер и активатор на транскрипционните протеини
 SVPs – субвирусни частици
 TLRs – Toll-like рецептори
 TMA – транскрипционно медирана амплификация
 WHV – хепатит В вирус, открит в северноамерикански мармоти
 WMHBV – хепатит В вирус, изолиран при мериносови маймуни

1. УВОД

Вирусните хепатити са едни от най-разпространените заболявания в света, включително и у нас. Повече от 50 години след откриването хепатит В вирусът (HBV) продължава да бъде един от най-значимите човешки патогени, отговорен за огромен брой остри и хронични инфекциозни заболявания в света. Значението на HBV се определя от широкото му разпространение, тежестта на протичане, усложненията след заразяване и/или преболедуване, леталитета, значителните трудозагуби и големите икономически щети. В Североизточна България според литературни данни HBV е етиологичен агент на около 30% от хроничните хепатити, а в случайно подбрана популация (12 – 60 г.) 5.2% от изследваните лица показват носителство на HBsAg и/или anti-HBc total. Според критериите на СЗО Североизточна България попада в зоната на висока средна ендемичност.

Предизвикателство в съвременната вирусология и хепатология са пациентите с неактивна HBV инфекция. При тях не се наблюдава HBsAg позитивност при позитивен резултат в теста за определяне на anti-HBc total и ниски серумни нива на HBV DNA. Това са пациенти с т.нар. окултна хепатит В вирусна инфекция (ОВІ). Окултният хепатит В е комплексно заболяване, което може да има различни клинични аспекти, включително да доведе до предаване на инфекцията при кръвопреливане или органна трансплантация, както и до реактивация при имunosупресирани пациенти. Този феномен потвърждава тезата, че на настоящото ниво на познание „ерадикация“ на HBV от чернодробните клетки е нереалистична. ОВІ е по-широко разпространена от очакваното и може да се идентифицира като значим рисков фактор за наличие на по-тежки чернодробни увреждания и по-бърза прогресия на чернодробната фиброза и другите усложнения.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО. ХИПОТЕЗИ

2.1. Цел на изследването

Целта на настоящия дисертационен труд е да се проследи разпространението на хепатит В вирусната инфекция в обща популация и етиологичната връзка на хепатит В вирус (HBV) и хепатит D вирус (HDV) при пациенти с хронични чернодробни заболявания в Североизточна България. Да се дефинира относителният дял на окултното хепатит В носителство в обща популация и при пациенти с различни хронични заболявания и чернодробна дисфункция. Да се проучи продължителността на постваксиналния имуноен отговор след масовото въвеждане на ваксинапрофилактика с HBV ваксина.

За постигането на научно-изследователската цел си поставихме следните основни задачи:

2.2. Задачи на изследването

➤ Задачи

- I. Да се дефинира разпространението на хепатит В вирусната инфекция в Североизточна България в случайно подбрана популация.
 - 1.1. Да се установи разпространението на серологичните маркери за хепатит В вирусна инфекция: HBsAg, anti-HBc total, HBeAg, Anti-HBeAg в ELISA и CLIA в случайно подбрана популация от лица, изследвани профилактично по желание, за медицински удостоверения, *in vitro* процедури, моряци.
 - 1.2. Да се дефинира относителният дял на заразените лица сравнително в зависимост от възрастта и пола.
- II. Да се проучи относителният дял и етиологичната връзка на HBV и HDV при пациенти с хронични чернодробни заболявания.

1.1. Да се установи разпространението на серологичните маркери за хепатит В и D вирусна инфекция: HBsAg, anti-HBc total Ab, HBeAg, Anti-HBeAg и anti-HDV Ab в ELISA при пациенти с хронични чернодробни заболявания.

1.2. Да се установи относителния дял на едновременно инфектираните с HBV и HDV пациенти с хронични чернодробни заболявания.

1.3. Да се приложат сравнително молекулярно-биологичните методи (Real-time PCR) за определяне вирусния товар на едновременно инфектираните (HBV и HDV) пациенти. Да се изследва взаимодействието между двата вируса съобразно използваните методи.

III. Да се определи относителният дял на окултно HBV носителство в Североизточна България

1.1. Да се дефинира разпространението на HBsAg негативните, anti-HBc total Ab положителни лица в случайно подбрана популация с приложение на ELISA и CLIA.

1.2. Да се изследват пациенти с различни хронични заболявания и данни за чернодробна дисфункция за окултно носителство на HBV в ELISA и PCR.

1.3. Да се направи сравнителен анализ, оценка на методите и резултатите, получени при изследване на лицата от случайно подбрана популация и пациентите с хронични заболявания и чернодробна дисфункция.

IV. Проучване продължителността на имунния отговор при ваксинирани за HBV лица в обща популация на възраст 6 м. – 20 г. в Североизточна България.

1.1. Да се изследва имунният anti-HBs Ab отговор при имунизирани лица в ELISA.

1.2. Да се сравнят резултатите в зависимост от възрастта и пола.

Хипотези

1. Поради масовата имунизация на новородените деца допускаме относителният дял на хронично заразените с HBV и тези с двойна HBV/HDV инфекция да намалява или да се измести в по-късна възраст.

2. Превалентността на ОВІ се различава твърде много в отделните региони по света и не е проучена в Североизточна България. ОВІ е важен фактор не само в развитието и прогресията на хроничните чернодробни заболявания, но и поради възможността за предаване на инфекцията към реципиенти на кръв, кръвни продукти, тъкани и органи, както и за обратно негативно развитие при пациенти под имunosупресия. Допускаме високо ниво на разпространение в региона.

Антитеза

Въпреки въведената масова имунизация на новородените деца и предвид доказаната висока средна ендемичност в региона относителният дял на хроничните HBV и HDV инфекции не показва тенденция към намаляване. ОВІ се среща много рядко.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Материали

Настоящото научно-изследователско проучване е проведено в периода септември 2010 г. – октомври 2018 г. Изследвани са общо 13 922 единични серумни проби от района на Североизточна България. Анализирани са проби на пациенти от обща популация, както и такива с хронични чернодробни заболявания за носителство на HBV и HDV маркерите. Изследванията са осъществени във Вирусологична лаборатория на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, Център по транслационна медицина и клетъчна терапия на УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, СМДЛ „Статус“ – Варна, както и НРЛ по хепатитни вируси към НЦЗПБ – София. Проучването е извършено в два етапа.

3.3.1. Ретроспективно проучване

Изследвани са общо 13 060 лица за носителство на HBV и HDV маркерите, в периода 2010 – 2015 г. (Табл. 1).

Таблица 1. Брой и относителен дял на ретроспективно изследваните пациенти според задачите на проучването

Задачи на изследването	Брой изследвани	Относителен дял (%) на изследваната популация
Проучване разпространението на HBV в обща популация от амбулаторни пациенти	8380	64.2% (95% CI: 36.6% – 45.9%)
Проучване разпространението на HBV и HDV при пациенти с хронични чернодробни заболявания	503	3.9% (95% CI: 3.5% – 4.2%)
Дефиниране разпространението на HBsAg негативни anti-HBc total положителни лица в случайно подбрана популация	2326	17.8% (95% CI: 17.2% – 18.5%)
Изследване на пациенти с различни хронични заболявания, включващи чернодробна дисфункция за дефиниране на „серологично тиха“ HBV инфекция	1596	12.2% (95% CI: 11.7% – 12.8%)
Изследване на пациенти с лабораторни данни за чернодробна дисфункция за окултно носителство на HBV	55	0.4% (95% CI: 0.3% – 0.5%)
Проучване продължителността на имунния отговор при ваксинирани за HBV лица на възраст 6 м. – 20 г.	200	1.5% (95% CI: 1.3% – 1.8%)
Общо	13060	100%

3.3.2. Проспективно проучване

Изследвани са общо 862 серумни/плазмени проби на пациенти за дефиниране разпространението на хепатит В и D в периода 2016 – 2018 г. (Табл. 2).

Таблица 2. Брой и относителен дял на проспективно изследваните пациенти според задачите на проучването

Задачи на изследването	Брой изследвани	Относителен дял (%) на изследваната популация
Проучване на разпространението на HBV и HDV при пациенти с хронични чернодробни заболявания	553	64.2% (95% CI: 60.8% – 67.4%)
Изследване на пациенти с хронични заболявания и данни за чернодробна дисфункция за окултно носителство на HBV	60	7.0% (95% CI: 5.4% – 8.9%)
Проучване продължителността на имунния отговор при ваксинирани за HBV лица на възраст 6 м. – 20 г.	249	28.9% (95% CI: 25.9% – 32.0%)
Общо	862	100%

3.2. Методи

За изпълнение на поставените задачи, в настоящия дисертационен труд са използвани методи разделени в четири основни групи: серологични, молекулярно-биологични, документален и статистически.

3.2.1. Серологични имуоензимни методи (ELISA и CLIA)

Използваните ELISA тестове са базирани на принципа на „сандвич“ и конкурентна ELISA и са изработени съобразно изискванията за тест процедурата на фирмата производител с търговски стандартизирани и високо чувствителни тест-китове в 96 ямкови плаки.

3.2.1.1. *ELISA тестове, базирани на принципа на директна „сандвич“ ELISA*, са тестовете за доказване на серологичните маркери – HBsAg (SURASE B-96 (Taiwan); Bioelisa HBsAg BLOKIT); HBeAg (HBeAg/ Ab DIA.PRO; EASE BN-96); Anti-HBs Ab (HBs Ab Dia.PRO). Тестът се изпълнява съгласно указанията на фирмата производител и се отчита при екстинкция 450 nm и на 650 nm като референтна дължина на вълната.

Материалът за изследване е взет в затворена система за отделяне на серум с гел Vacutainer SST II Advance на фирмата Becton Dickenson. След венепункцията кръвта е оставена 30 минути на стайна температура, за да се осъществи кръвосъсирването и след това серумът е отделен чрез центрофугиране за 5 минути на 3000 g и е съхраняван на -20 °C до осъществяването на анализа.

3.2.1.2. *ELISA тестове, базирани на принципа на конкурентна ELISA технология*, са тестовете за доказване на серологичните маркери anti-HBc total Ab (ETI-AB-COREK-2 DiaSorin; HBcAb Dia.PRO); Anti-HBe Ab (HBeAg/Ab DIA.PRO); Anti-HDV Ab (HDV Ab Dia Pro). Тестът се изпълнява съгласно указанията на фирмата производител и се отчита при екстинкция 450 nm и на 650 nm като референтна дължина на вълната.

Материалът за изследване е взет в затворена система за отделяне на серум с гел Vacutainer SST II Advance на фирмата Becton Dickenson. След венепункцията кръвта е оставена 30 минути на стайна температура, за да се осъществи кръвосъсирването и след това серумът е отделен чрез центрофугиране за 5 минути на 3000 g и е съхраняван на -20 °C до осъществяването на анализа.

3.2.1.3. *CLIA технологията* се използва от нас за определяне на маркерите HBsAg, anti-HBc total, anti-HBs Ab посредством китовете LIAISON® HBsAg LIAISON®; Anti-HBc Diasorin, Italy; LIAISON XL Murex Anti-Hbs. Тестът се изпълнява съгласно указанията на фирмата производител, като светлинният сигнал и съответно количеството конюгат/изолуминол/антитяло(антиген) се измерва чрез фотомултипликатор в относителни светлинни единици (RLU) и е пропорционално на концентрацията на търсения маркер.

Материалът за изследване е взет в затворена система за отделяне на серум с гел Vacutainer SST II Advance на фирмата Becton Dickenson. След венепункцията кръвта е оставена 30 минути на стайна температура, за да се осъществи кръвосъсирването и след това серумът е отделен чрез центрофугиране за 5 минути на 3000 g и е съхраняван на -20 °C до осъществяването на анализа.

3.2.2. Молекулярно-биологични методи за доказване и количествено определяне на HBV DNA и HDV RNA. Екстракция и амплификация на HBV DNA и екстракция, обратна транскрипция и амплификация на HDV RNA в Real-time RCR.

HBV DNA

3.2.2.1. *За изолиране на HBV DNA* е използван тест Magrev Viral DNA/RNA Extraction Kit (Anatolia geneworks). Китът за изолиране на HBV DNA е базиран на магнитни частици за ръчна екстракция от 500 µl серум/плазма и е CE/IVD сертифициран. Процедурата е осъществена съгласно указанията на производителя.

За изолиране и амплификация на HBV DNA в 500 µl човешка плазма или серум посредством Real-time RCR използвахме *Abbott Real time HBV* тест, като се работи с Abbott m2000sp апарати за автоматизиран PCR. Таргетната секвенция на HBV DNA се състои от високо консервативен участък на S гена, който е водещ при сглобяването и секрецията на субвирусните частици. За Internal control е избрана ДНК секвенция, която не е свързана с HBV таргетната последователност (от гена на хидроксипируват редуктазата на растението Cucurbita pero) и се въвежда с всяка проба в началото на подготовката на процедурата.

Количеството на таргетната HBV, което присъства във всеки цикъл на амплификация, се доказва чрез сонда специфична за HBV с флуоресцентно багрило. Амплификационният цикъл, при който флуоресцентният сигнал се открива от Abbott m2000rt, е пропорционален на концентрацията на HBV DNA, присъстваща в пробите. Тестът на *Abbott RealTime HBV PCR* е стандартизиран според *The 1st WHO International Standard* за вируса на хепатит В (97/746), като резултатите се отчитат в международни единици на милилитър (IU/mL). Чувствителността на теста варира от <10 IU / mL до > 1 000 000 000 IU / mL, като 1 IU/mL е 3.41 copies/mL.

3.2.2.2. *Тестът Bosphore HBV Quantitation/Detection kit (Anatolia geneworks)* е за количествена детекция на HBV в серум/плазма, посредством двустъпкова амплификация на консервативен участък от S гена. Линейният диапазон на теста е от 1×10^1 IU/mL до 1×10^9 IU/mL, получен чрез анализ на множество серийни разреждания, съгласно *2nd WHO International Standard* (97/750). Чувствителността на теста е 10 IU/mL, като 1 IU/mL е равна на $4,5 \pm 0,2$ copies/mL.

Амплификацията е извършена с PCR инструмент QuantStudio™ Dx в краен обем 25µl реакции.

HDV RNA

3.2.2.1. *Екстракцията на HDV RNA* се извърши чрез Real-time PCR с тест за количествена детекция на HDV в 200 µl плазма/серум и други биологични материали- Viral DNA/RNA Purification Kit 50, Fermentas, Life Sciences (кат.№DK0011). Тестът отговаря на изискванията, посочени в Директива 98/79/ЕО, приложение I, и е в съответствие с изискванията на Директива 98/79/ЕО, приложение III.

3.2.2.2. *Обратна транскрипция на HDV RNA* до HDV cDNA се осъществи с помощта на FirstStrand cDNA Synthesis kit, Thermo Scientific (кат. № K1691). Комплектът използва RevertAid Reverse Transcriptase (RT) – обратна транскриптаза, която е генетично модифицирана M-MuLV RT и ензимът поддържа активност при 42 °C – 50 °C, и е подходящ за синтез на cDNA до 13 kb. В края на процеса се получават по 20 µl cDNA, която може да се използва директно за PCR амплификация или да се съхраняват при – 20 °C (за по-малко от седмица), или –70 °C за по-дълъг период.

3.2.2.3. Получената cDNA се амплифицира в количествен Real-time PCR (PrimerDesign™ Ltd, Genesig, кат. № K0231). Таргетният регион е Large HD антигена на HDV. Вирусът се доказва чрез сонда специфична за HDV с флуоресцентно багрило, като полученият флуоресцентен сигнал позволява количествени измервания на натрупването на продукта по време на експоненциалните етапи на PCR, както и Internal control.

Амплификацията е извършена с PCR инструмент QuantStudio™ Dx в краен обем 20µl реакции.

3.2.2. Документален метод

Проучени са глобалните анализи на WHO, EASL, CDC и данните от нашата и световна литература по отношение на хроничните HBV и HDV хепатити. Събрани са данни от медицинската документация на по отношение на клинично-лабораторни показатели, клиничен стадий на инфекцията и хистологичния вариант.

3.2.3. Статистически методи

За оценка на зависимостите използвахме Chi-Square test (Хи-квадрат, χ^2) на Pearson, Spearman's rank correlation и тест на Fisher. Констатиранията различия са приети за статистически значими, потвърждаващи алтернативната хипотеза при $p < 0.05$. Преди започване на работа със събраната информация се извърши тест за нормалност на разпределението на информацията (Kolmogorov – Smirnov), който определи използването на параметрични или непараметрични методи за анализ. Клиничната информация, събрана от всички пациенти, е обобщена в Microsoft Office Excel 2010, а статистическият анализ е

осъществен чрез IBM SPSS Statistics v.23, откъдето изведохме: показатели за относителен дял(%), средна възраст (SD±), интервалите на доверителност (95%CI); средна аритметична стойност на изследваните величини (mean) ±стандартно отклонение (SD).

Проведените проучвания и съответно получените резултати, включени в дисертационния труд, са съгласувани и одобрени от Комисията по научна етика при Медицински университет – Варна (Протокол/Решение №61, от заседание на: 30.03.17г.) при спазване на изискванията на чл. 28 от Закона за здравето. Изследванията са извършени след писмено декларирано информирано съгласие за участие.

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

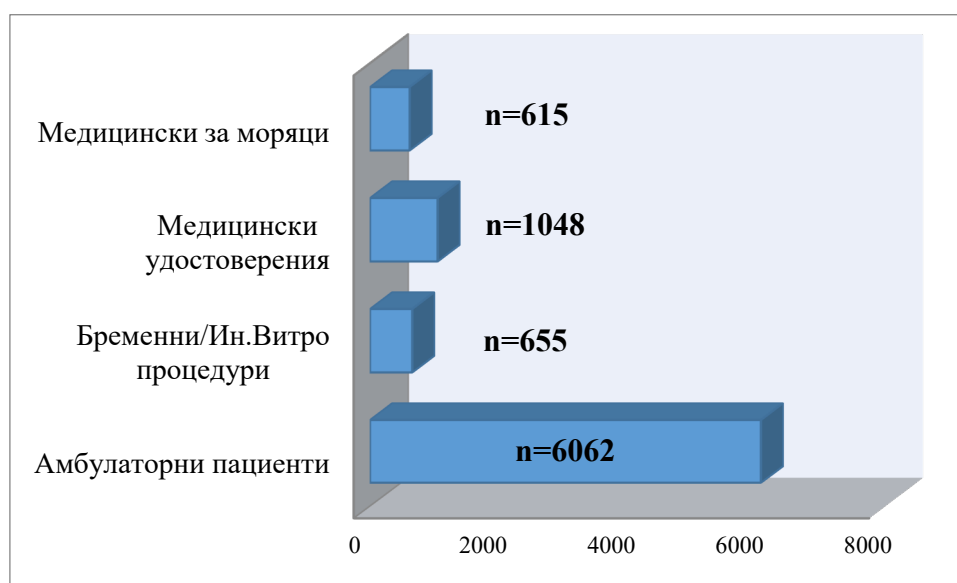
4.1. Дефиниране на разпространението на Хепатит В вирусната инфекция в Североизточна България в случайно подбрана популация

Установяване на разпространението на серологичните маркери за хепатит В вирусна инфекция. Дефиниране на относителния дял на заразените лица сравнително в зависимост от възрастта и пола

Описание на извадката

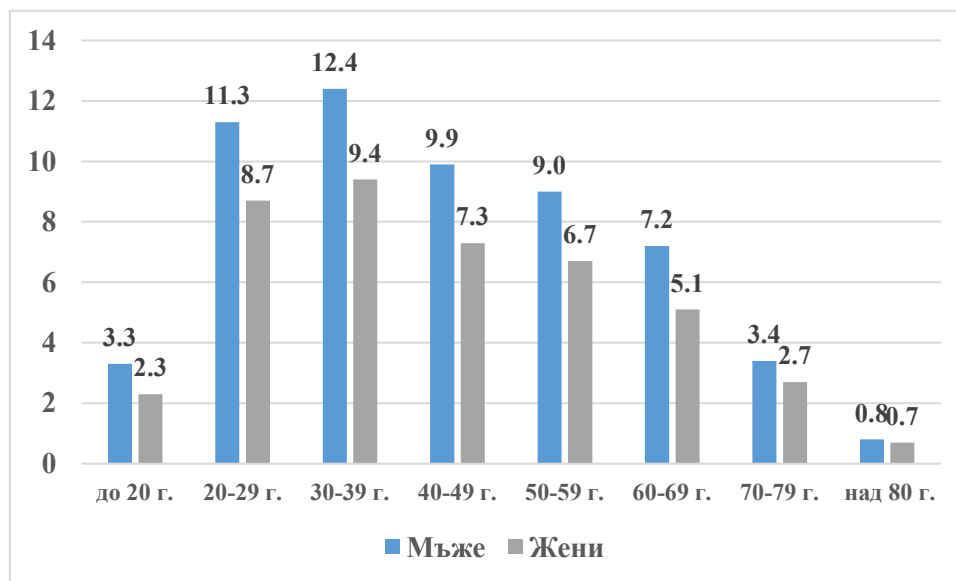
Настоящото ретроспективно проучване обхваща периода 2011 – 2015 г. Изследвани са общо 8 380 лица в Лаборатория Вирусология на УМБАЛ „Св.Марина“ – Варна и СМДЛ „Статус“ – Варна. Приложени са серологичните методи ELISA и CLIA. В проучването са включени следните серологични маркери – HBsAg, anti-HBc total Ab, HBeAg, anti-HBe Ab и anti-HBs Ab. Средната възраст на таргетната група е 43.14 години (SD±17.02). Относителният дял на изследваните мъже е 57.3% (95% CI: 56.2% – 58.4%, n= 4802) и е по-висок от относителния дял на изследваните жени – 42.7% (95% CI:41.6% – 43.8%, n=3578).

В нашето проучване преобладават амбулаторно изследвани лица по желание, или насочени от лекар с профилактична цел, или с цел текущо проследяване на серологичните хепатитни маркери (Фиг. 1). Те съставляват 72.3% (95% CI: 71.4% – 73.3%, n=6062). За издаване на медицински удостоверения са тествани 12.6% (95% CI: 11.8% – 13.2%, n=1048), за издаване на медицински удостоверения на моряци – 7.3% (95% CI: 6.8% – 7.9%, n=615). Изследваните скринингово бременни жени съставляват 7.8% (95% CI: 7.2% – 8.4%, n=655).



Фигура 1. Разпределение на изследваните лица в зависимост от повода за изследване (n=8380)

При разделяне на участниците в 8 възрастови групи и равни интервали от 10 години установихме преобладаване на изследваните мъже във всички възрастови групи. Най-висок процент изследвани мъже беше регистриран във възрастов диапазон 20 – 39 г. (Фиг. 2). Лицата до 20 години съставляват 5.5% (95% CI: 5.0% – 6.0%, n=461), а тези над 80 години – 1.5% (95% CI: 1.3% – 1.8%, n=126). Изследваните лица в нашата извадка са преимуществено в средна възраст.



Фигура 2. Разпределение на изследваните лица в обща популация в зависимост от възрастта и пола в % (n=8380)

Всички лица (n=8380) са изследвани в единични серумни проби за носителство на HBsAg. Бременните жени в нашето проучване (n=655) са изследвани за носителство на HBsAg във връзка с изискванията на МЗ за превенция и контрол на HBV инфекцията и намаляване риска от вертикална трансмисия и заразяване на плода. За носителство на anti-HBc total Ab са тествани 7.4%(95%CI:6.8% – 7.9%, n= 617) от всички лица, на anti-HBs Ab – 6.1% (95% CI: 5.6% – 6.6%, n= 509), на HBeAg – 4.4% (95% CI: 4.0% – 4.9%, n= 371) и на anti-HBe Ab – 4.6% (95% CI: 4.2% – 5.1%, n= 386).

Резултати и обсъждане

За дефиниране разпространението на HBsAg в обща популация изследвахме 8380 лица. Относителният дял на позитивните е 2.8% (95% CI: 2.5% – 3.2%, n= 235) (Табл. 3).

Таблица 3. Относителен дял на HBsAg позитивните лица

HBsAg	Брой	%
Позитивни	235	2.8
Отрицателни	8145	97.2
Общо	8380	100.0

Серологичният маркер Anti-HBc total е тестван при 617 лица. Положителни резултати установихме в 42.3% (95% CI: 38.4% – 46.3%, n= 261) (Табл. 4).

Таблица 4. Относителен дял на Anti-HBc total позитивните лица

Anti-HBc total Ab	Брой	%
Позитивни	261	42.3
Отрицателни	356	57.7
Общо	617	100.0

Маркер anti-HBs е изследван в 509 единични серумни проби. Положителни резултати получихме в 49.1% (95% CI: 44.7% – 53.6%, n= 250) (Табл. 5).

Таблица 5. Относителен дял на Anti-HBs позитивните лица

Anti-HBs Ab	Брой	%
Позитивни	250	49.1
Отрицателни	259	50.9
Общо	509	100.0

За определяне на серологичен маркер HBeAg са изследвани 371 лица. Положителни резултати констатирахме в 8.6% (95% CI: 6.0% – 12.0%, n= 32) (Табл. 6).

Таблица 6. Относителен дял на HBeAg позитивните лица

HBeAg	Брой	%
Позитивни	32	8.6
Отрицателни	339	91.4
Общо	371	100.0

Anti-HBe тествахме при общо 386 лица. Положителни резултати установихме в 73.8% (95% CI:69.1% – 78.2%, n= 285) (Табл. 7).

Таблица 7. Относителен дял на Anti-HBe Ab позитивните лица

Anti-Hbe Ab	Брой	%
Позитивни	285	73.8
Отрицателни	101	26.2
Общо	386	100.0

Обобщените данни от нашето проучване са представени в Табл. 8.

Таблица 8. Относителен дял на позитивните лица за различните HBV маркери

Маркер	Брой (n) положителни	%	95%CI
HBsAg	235/ от 8380	2.8 %	(2.5% – 3.2%)
Anti-HBc total	261/ от 617	42.3 %	(38.4% – 46.3%)
Anti-HBs Ab	250/ от 509	49.1 %	(49.1% – 53.6%)
HBeAg	32/ от 371	8.6 %	(6.0% – 12.0%)
Anti-Hbe Ab	285/ от 386	73.8 %	(69.1% – 78.2%)

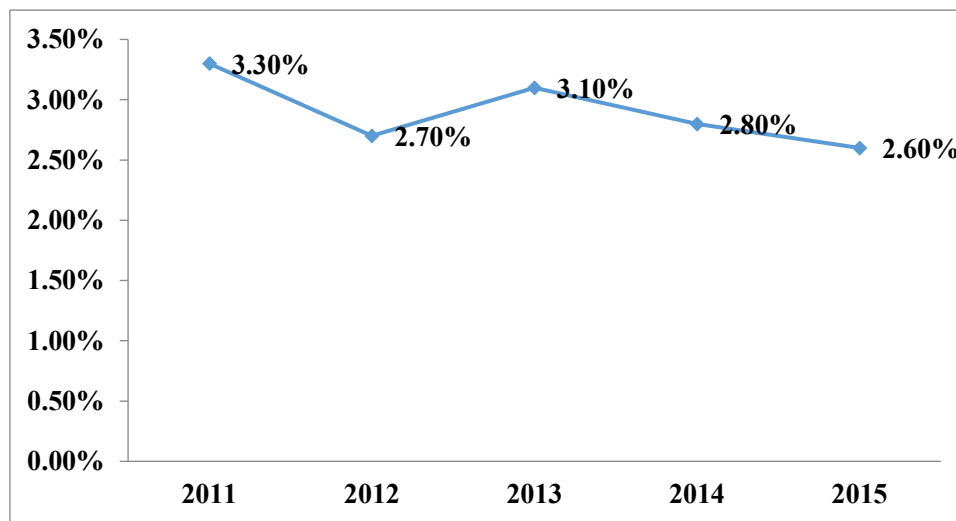
Серологичният маркер anti-HBc IgM Ab, като белег за остра инфекция съгласно фокуса на нашата работа, не е търсен и не е изследван.

Носителство на HBsAg в обща популация

През 2011 г. са изследвани 13% от всички включени в извадката (95% CI:12.3% – 13.7%, n=1090), и HBsAg позитивни са 3.3% от доказаните от нас позитивни лица(95% CI: 2.3% – 4.5%, n=36). През 2012 г. са изследвани 12.5% (95% CI: 11.8% – 13.3%, n=1050) от лицата и HBsAg позитивни са 2.7%(95% CI: 1.8% – 3.8%, n=28). През 2013 г. са изследвани – 11.5% (95% CI: 10.8% – 12.2%, n=960) лица, като относителния дял на позитивните е 3.10%(95% CI: 2.1% – 4.4%, n=30). Най-много са тестваните през 2014 – 33.1% (95% CI: 32.1% – 34.1%, n=2774) с HBsAg позитивни 2.8% (95% CI: 2.2% – 3.5%, n=2774). През 2015 г. изследваните

съставляват 29.9% (95% CI: 28.9% – 30.9%, n=2506) от всички, с относителен дял от общо HBsAg позитивните 2.6% (95% CI: 2.0% – 3.2%, n=2506).

В периода на нашето проучване установихме общо 235 HBsAg положителните лица. Разпределението на HBsAg положителните лица от всички изследвани е представено на Фиг. 3.



Фигура 3. Относителен дял на HBsAg позитивните лица в обща популация в периода на изследване (n=8380)

Според данни на СЗО около 2.5 милиарда души са преболедували от хепатит В, като повече от 400 милиона имат хронична HBV инфекция (WHO, 2000; Maclachan J, 2015). По литературни данни носителите на HBV в световен мащаб са около 5%, а хроничните носители – 257 милиона, което съставлява около 3.5 % от световното население (Stasi C et al., 2017). Усложненията от HBV инфекцията са причина за 66% от всички смъртни случаи от вирусни хепатити, като от 2000 г. досега се регистрира тенденция за ръст на смъртността с 22%. На Стария континент честотата на хроничното носителство се повишава от север на юг и от запад на изток, варирайки между 0.1 % в Холандия и повече от 7% в Източна Турция (Hatzakis A et al., 2013, Todorova T et al., 2016). Според СЗО, относителният дял на разпространение на HBV в световен мащаб е 1.6%. България попада в зона на средна ендемичност, където средно 2% (3% – 5%) са носителите на HBsAg, а маркери за HBV инфекция се срещат при 20% – 60% от населението (WHO, 2015). Според изнесените от нас обобщени данни за периода от 2011 – 2015 г., относителният дял на HBsAg носителите е 2.80%. През изследвания период регистрирахме постепенно намаляване на това ниво – от 3.30% през 2011 г., до 2.60% през 2015 г. Независимо от благоприятната тенденция, Североизточна България остава в междинната ендемична зона. По данни за цялата страна превалентността на HBsAg положителните лица в обща популация през 1999 г. е 3.9% (Gubev E et al., 1987; Kojuharova M et al., 2001). При изследване през 2011 г., данните показват превалентност 3.8%, като резултатите варират за различните региони в страната от 1.9% до 5.3% (Kevorkyan A et al., 2015). В Североизточна България, според литературни данни, HBV е етиологичен агент на около 30% от хроничните хепатити, а в случайно подбрана популация, маркери HBsAg в съчетание с anti-HBc total (12 – 60 г.) са регистрирани в 5.3% (Иванова Л и съавт., 2011). Отчетеният от нас спад след 2011 г. може да се обясни с увеличаване броя на ваксинираните лица, включени в проучването и ефективността на задължителната ваксинация в страната. От друга страна, може да се обсъжда възможно участие на HBsAg негативирали се хронични HBV носители. Този спад в относителния дял на HBsAg носителите в обща популация съвсем отчетливо се наблюдава след 2013 г.

От изследваните бременни жени в нашето проучване (n=655), HBsAg позитивни са 1.8% (95% CI: 1.0% – 3.2%, n=12). Наблюдаваме намаляване относителния дял на бременните

жени, носители на HBsAg, което е много положителна тенденция, като се има предвид възможно неблагоприятното въздействие на HBV върху плода и новороденото дете от серопозитивна майка. При проучване на бременни жени от Варна и Варненски регион на възраст 16 – 45 г. в периода 2009 – 2013 г. от събраните 2702 серологични проби 61 са HBsAg положителни. Определената честота на разпространение на HBV при бременните жени според авторите е 2.26%, като най-висока е през 2010 г. (2.88%), а най-ниска – през 2012 г. (0.99%) (Tsankova G et al., 2016). В последните две десетилетия се отчита трайна тенденция за намаляване относителния дял на разпространение на HBsAg в нашата страна. По данни за София, през 1987 г., 5.1% от донорите на кръв са HBsAg позитивни, докато през 2007 г. намаляват на 2.2% (Krastev Z et al., 2011). Според данни от литературата честотата на HBsAg позитивните лица в Стара Загора е 2.5%, в Пловдив – 3.9%, в Плевен – 4.9% (Атанасова М, 2016).

Възрастово и полово свързано разпространение на HBsAg

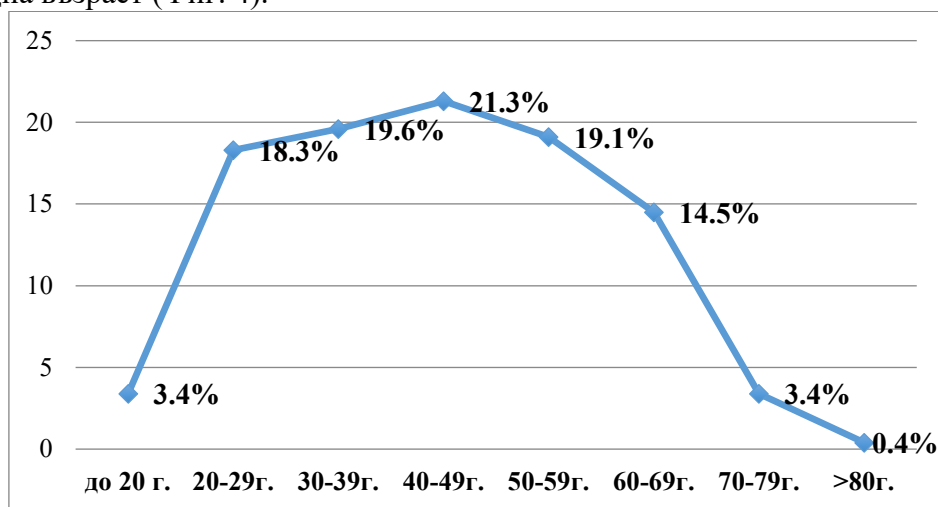
При разпределяне на изследваните лица за носителство на HBsAg в осем възрастови групи (Табл. 9), установихме постепенно нарастване относителния дял на позитивните лица след 20-годишна възраст. Във възрастов диапазон 30 – 59 г. установихме близки стойности. Процентно най-голяма честота положителни резултати наблюдаваме при лицата във възрастов диапазон 40 – 49 г. В сравнителен аспект с данните за HBsAg положителните лица по групи, в тези под 20 и над 80 години, открихме статистически значима разлика между по-ниския относителен дял на положителните резултати и възрастовата променлива ($\chi^2=26.4$; $p=0.004$), (Cramer V = 0.040, $p=0.020$).

Таблица 9. Разпределение на HBsAg положителните лица в зависимост от възрастта

Възраст (години)		HBsAg позитивни	
	< 20 г.	брой	8/235
		%	3.4%
	20 г. – 29 г.	брой	43/235
		%	18.3%
	30 г. – 39 г.	брой	46/235
		%	19.6%
	40 г. – 49 г.	брой	50/235
		%	21.3%
	50 г. – 59 г.	брой	45/235
		%	19.1%
	60 г. – 69 г.	брой	34/235
		%	14.5%
	70 г. – 79 г.	брой	8/235
		%	3.4%
	>80 г.	брой	1/235
		%	0.4%
Общо		брой	235
		%	100.0%

При проучване в България, проведено при лица от обща популация, превалентността на HBsAg позитивните до 19 г. е значително по-ниска от тази при лицата над 20 години, обхванати от задължителната имунизация (1% vs.4.8%) (Kevorkyan A et al., 2015). Младешите около 20-годишна възраст са най-уязвимата група, тъй като една част от тях са включени в задължителната ваксинационна програма, а други вероятно не са включени (Тодорова Т и съавт., 2016). В настоящото проучване лицата под 20 г. са HBsAg позитивни в 3.4 % (95% CI: 1.5% – 6.6%, $n=8$) съотнесено към всички позитивни ($n=235$). HBsAg позитивните лица над 20-

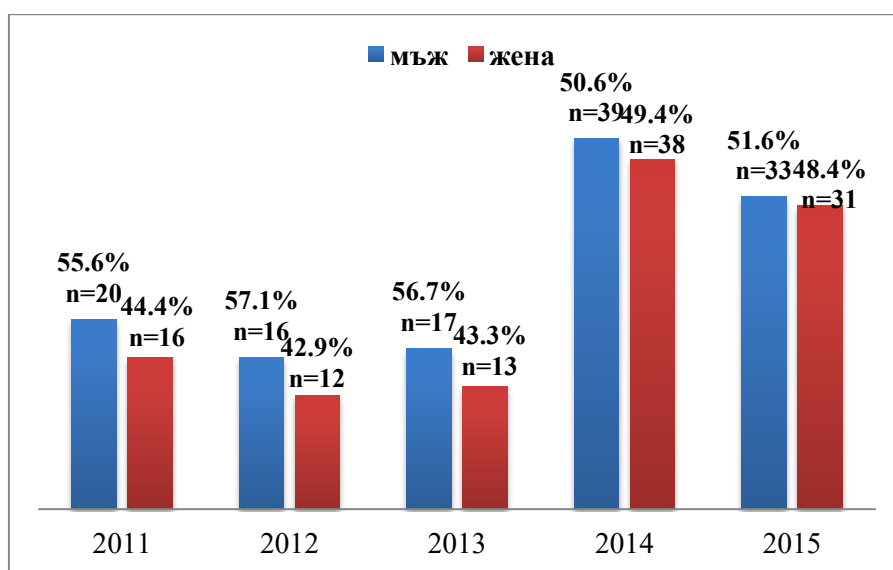
годишна възраст, съставляват 96.6% (95% CI: 94.3% – 98.5%, n=227) от всички серопозитивни в нашето проучване. Разликата между HBsAg позитивността и възрастовата променлива в двете групи изследвани е статистически значима ($X^2= 5.6$, $p= 0.001$). Това ни доближава до изнесените в литературата данни за преимуществено заразяване след 20-годишна възраст и пик – в средна възраст (Фиг. 4).



Фигура 4. Възрастово свързано разпространение на HBsAg позитивните лица (n=235)

Нашите резултати потвърждават доминантно хоризонталния път на предаване на инфекцията предимно след 20-годишна възраст, вероятно при лица, които не са включени в имунизационната програма на страната. Положителните лица са в близък относителен дял във възрастов диапазон 30 – 59 г. (19.6% – 21.3% – 19.1%) и отразяват рискови експозиции с пик в средна възраст, т.нар. „кохортен механизъм“. С напредване на възрастта и вероятно поради по-високия леталитет, относителният дял на HBsAg позитивността драстично намалява и достига 0.4% във възраст над 80 г.

При разпределението на лицата по пол установихме преваляване на HBsAg положителните мъже – 53.2% (95% CI: 46.6% – 59.7%, n=125), в сравнение с HBV позитивните жени – 46.8% (95% CI: 40.3% – 53.4%, n=110). Във всяка една от включените години на наблюдение, броя на HBsAg положителните мъже превалява над този на положителните жени (Фиг. 5).

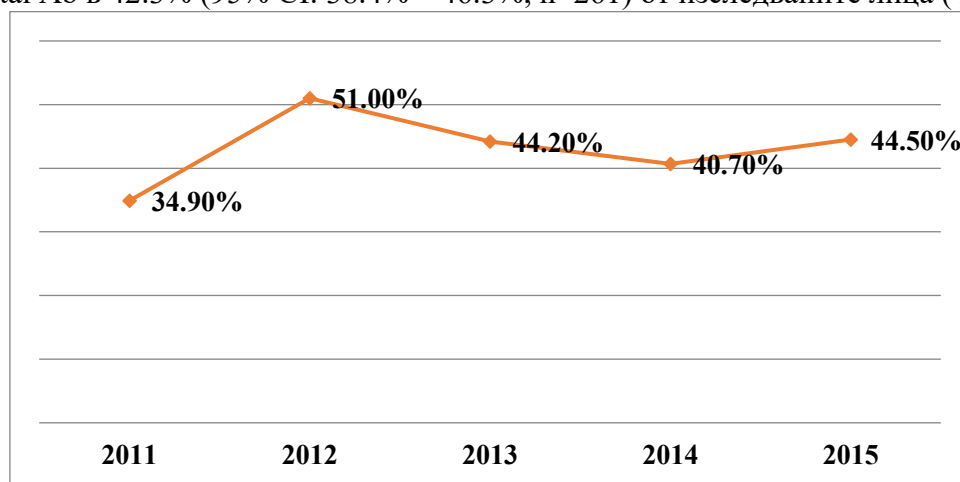


Фигура 5. Разпределение на HBsAg позитивните лица в зависимост от пола (%) в изследвания период

Въпреки по-високия относителен дял на положителните лица от мъжки пол в сравнение с този при жените в целия период на наблюдение, резултатите от Хи-квадрат сравнителния анализ не потвърдиха статистическата значимост на тази разлика и нейната свързаност с пола на позитивните лица ($\chi^2=19.5$; $p=0.87$).

Носителство на anti-HBc total Ab в обща популация

В нашето проучване получените anti-HBc total положителни резултати през 2011 г. са 34.9% (95% CI: 24.9% – 45.9%, $n=30$) от изследваните лица, през 2012 г. – 51.0% (95% CI: 36.6% – 65.2%, $n=26$). Изследваните лица през 2013 г. са най-малко, като положителни са 44.2% (95% CI: 29.1% – 60.1%, $n=19$) от изследваните лица. Най-голям брой изследвания по този маркер са извършени през 2014 г., като положителни са 40.7% (95% CI: 34.2% – 47.4%, $n=92$) и през 2015 г., с положителни са резултати в 44.2% (95% CI: 37.7% – 51.5%, $n=211$) от изследваните лица. Обобщените данни от нашето проучване в обща популация показват средно носителство на anti-HBc total Ab в 42.3% (95% CI: 38.4% – 46.3%, $n=261$) от изследваните лица (Фиг. 6).



Фигура 6. Относителен дял на anti-HBc total положителни лица в обща популация ($n=617$)

Много често anti-HBc total е в комбинация с друг HBV серологичен маркер. Не обсъждаме изолирани anti-HBc total Ab профили, които са обект в раздела за окултен хепатит В. Разпространението на anti-HBc total следва тренда на разпространение на HBsAg за съответната зона на ендемичност. Получените от нас резултати съвпадат с данните на СЗО, според които в зоните на интермедиерна ендемичност в разпространението, положителни HBV маркери се срещат при 20% – 60% от населението (WHO, 2015). В литературата открихме данни за по-нисък процент разпространение на anti-HBc total в европейски регион, където относителният дял е средно 31.0% в изследвана обща популация и 68.8% в изследвана рискова популация (наркомани, затворници, мигранти). В този регион съгласно класификацията, като рискови са включват страни като Албания, България, Румъния и Турция (Merrill R, Hunter B, 2011). Според същото проучване, в страни като Белгия, Германия, Англия, Италия и Гърция, разпространението на anti-HBc total в обща популация е 8.8% и 19.0% в рисковите групи. Информацията се основава на проучвания, проведени в тези държави, и е усреднена за подрегиона според СЗО. Според други данни за България, относителният дял на anti-HBc total позитивните лица в обща популация е в рамките на 17.8% – 38.6% и е различна за различните региони (Petrunov B et al., 2002, Teoharov P., 2011).

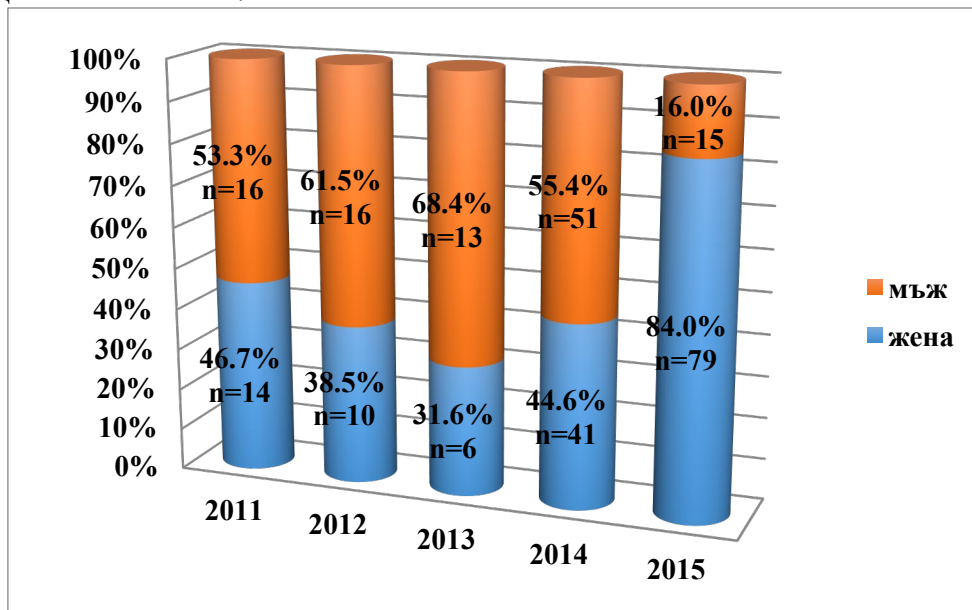
Възрастово и полово свързано разпространение на anti-HBc total

След разпределението на лицата в осем възрастови групи и равни интервали от 10 години резултатите показаха, че процентно най-голяма честота на положителните резултати има във възрастов диапазон 50 – 69 г., като близки стойности в относителните дялове позитивност установихме в по-широк възрастов диапазон 40 – 69 г. Разликата в

положителните резултати по маркер anti-HBc total няма обвързаност с възрастовата променлива ($X^2=12.5$; $p=0.89>0.05$) В групата на anti-HBc total положителните лица открихме статистически значима разлика между тези под 20 години ($n=6$) и над 20-годишна възраст ($n=255$). Участниците под 20-годишна възраст съставляват 2.3% (95% CI: 0.8% – 4.9%, $n=6$), а тези над 20 години, съответно 97.7% (95% CI: 95.1% – 97.2%, $n=255$) от всички anti-HBc total положителни индивиди. Разликата е статистически значима и обвързана с възрастта ($X^2 = 5.8$; $p= 0.002$), въпреки че силата на корелация е слаба (Cramer V= 0.026; $p=0.002$).

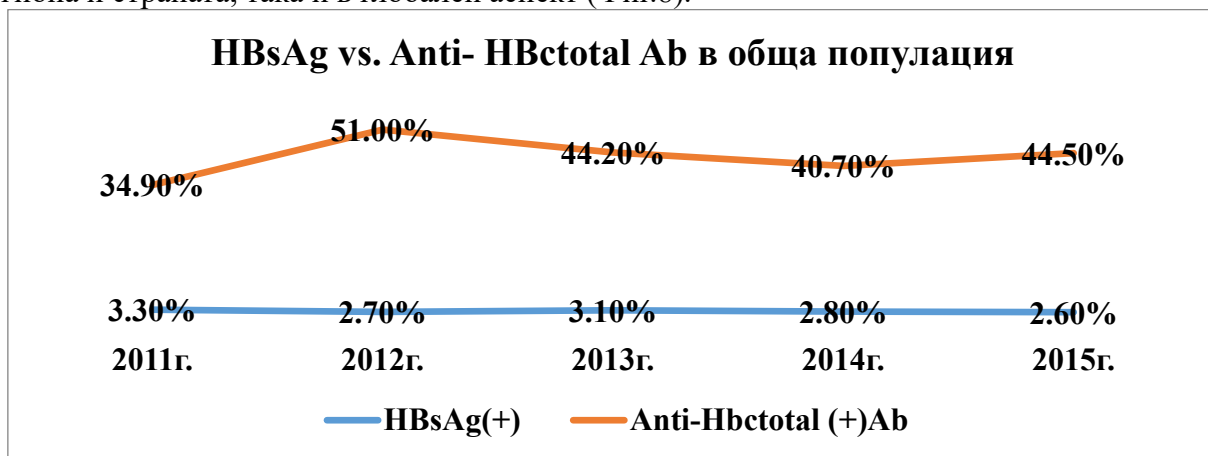
При сравняването на този ключов за HBV инфекцията серологичен маркер по пол, anti-HBc total положителните мъже са 57.5% (95% CI: 51.2% – 63.5%, $n=150$) и превалират над anti-HBc total положителните жени – 42.5% (95% CI: 36.5% – 48.8%, $n=111$).

Разпределението на anti-HBc total Ab положителните лица по години в зависимост от пола е представено на Фиг. 7.



Фигура 7. Разпределение на anti-HBc total Ab положителни лица в зависимост от пола (%) ($n= 261$) в изследвания период

Получените от нас данни ясно очертават тенденцията за повишаване относителният дял на anti-HBc total положителни лица в обща популация с напредване на възрастта, като белег на преминала HBV инфекция, безсимптомно носителство, или хронифициране на инфекцията и понижаване относителния дял на носителите на HBsAg. Тази тенденция се оформя, както за региона и страната, така и в глобален аспект (Фиг.8).



Фигура 8. Сравнителни резултати от разпространението на HBsAg и anti-HBc total в обща популация

Повишаването на относителния дял на преболедувалите от хепатит В, както и на хроничните HBV носители за сметка на новозаразените лица и тези с активна хронична инфекция, се дължи на ефективната имунизационна програма, все по-масовото търсене и изследване на този маркер и активната антивирусна терапия.

Носителство на anti-HBs Ab в обща популация

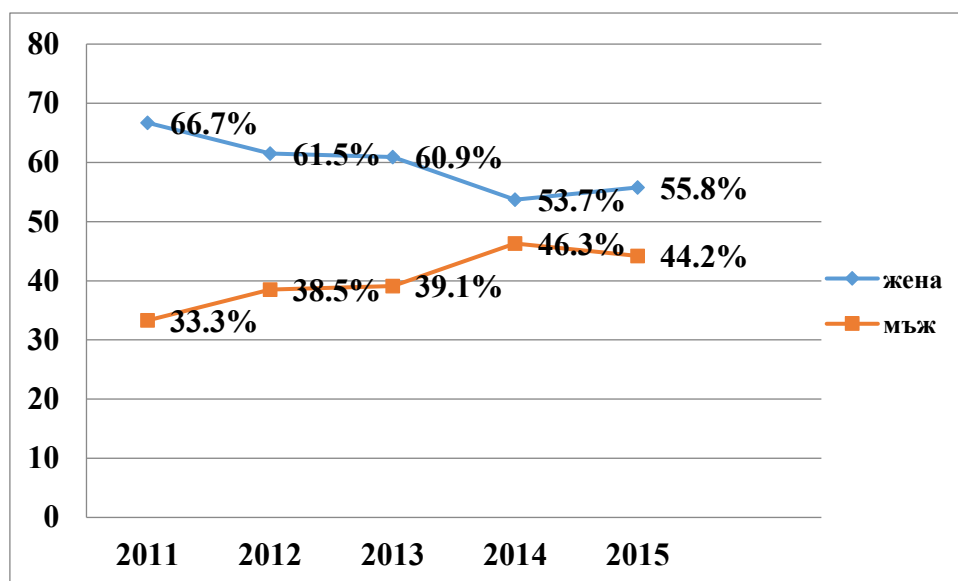
Изследвани са 509 случайно подбрани лица. Серологичният маркер anti-HBs Ab е положителен (над 10 mIU/mL) в 49.1% (95% CI:44.7% – 53.6%, n=250) от случаите. Изследването е направено с цел уточняване на серологичния HBV профил на индивидите, изследвани по желание и не са отдиференцирани тези, които са ваксинирани, или са лица с анамнестични данни за отминала HBV инфекция.

Възрастово и полово свързано разпространение на anti-HBs Ab

При разпределението по възрастови групи в 10 годишни интервали установихме значително по-малък брой изследвани лица на възраст под 20 години – 2.2% (95% CI:1.1% – 3.8 %, n=11) от всички изследвани (n=509). Тестваните индивиди над 20-годишна възраст съставляват 96.5% (95% CI: 94.5% – 97.9%, n=491). При сравняване на получените резултати в съответните възрастови интервали, най-висок относителният дял anti-HBs положителни лица установихме във възраст под 20 години – 54.5%, въпреки малкия брой изследвани лица. Най-нисък е относителният дял на позитивните над 80-годишна възраст (36.4%).

Трябва да направим уточнение, че включените в проучването лица от обща популация са с неизвестен за нас имунизационен статус и това се отнася за всички възрастови групи. Не разполагаме с данни за това дали са преболедували от остра инфекция или са имунизирани. Постимунизационният имунен отговор на евентуално имунизирани или поучили бустер доза ваксина срещу хепатит В също е неизвестен.

Относителният дял на разпространение на anti-HBs антитела се различава при двата пола (Фиг. 9). В хода на ретроспективното изследване превалят положителните резултати при жените – 57.2% (95% CI: 50.8% – 63.4%, n=143), в сравнение с anti-HBs положителните мъже – 42.8% (95% CI: 36.6 – 49.2%, n=107). Женски пол доминира през целия период на проучването. Поради недостатъчното търсене на този маркер в амбулаторни условия, броят на включените лица в годините е по-малък и не можем с категоричност да дефинираме причината за наличието им в серума на изследваните – поради преболедуване и оздравяване от остър В хепатит или са изградени в резултат на ваксинация.



Фигура 9. Разпределение на anti-HBs Ab позитивните лица в зависимост от пола (%) (n=250)

Въпреки доказаните от нас процентни различия в относителните дялове на положителните мъже и жени, с Хи-квадрат анализ не установихме статистически значима разлика свързана с пола ($p=0.74$; $p>0.05$).

Носителство на HBeAg в обща популация

Серологичният маркер HBeAg е изследван при 371 случайно подбрани лица. Положителни резултати получихме при малък брой от тях, съставляващ 8.6% (95% CI: 6.0% – 12.0%, $n=32$) за целия период на наблюдение. Търсенето на този маркер в обща популация е много ограничено. Лицата, включени в нашето проучване са насочвани обикновено към панела HBeAg/Anti-HBe Ab от специалист-гастроентеролог и с профилактична цел почти не се търсят. Това вероятно е и причината, поради която не открихме данни на други автори за разпространението на тези маркери в обща популация за България. HBeAg се изследва за диагностициране на остър активен хепатит В, или при хроничното HBV носителство – за дефиниране на реактивация. При съмнение на активен хепатит В, HBeAg винаги се включва заедно с останалите маркери – HBsAg, Anti-HBc total Ab, anti-HBc IgM, anti-HBe Ab и самостоятелно почти не се изследва. Наличието на HBeAg в серума е белег за вирусна репликация и корелира с високи нива на HBV DNA и повишен риск от последващо развитие на чернодробна цирроза и хепатоцелуларен карцином (Pawlotsky JM 2002; Yang I, 2002).

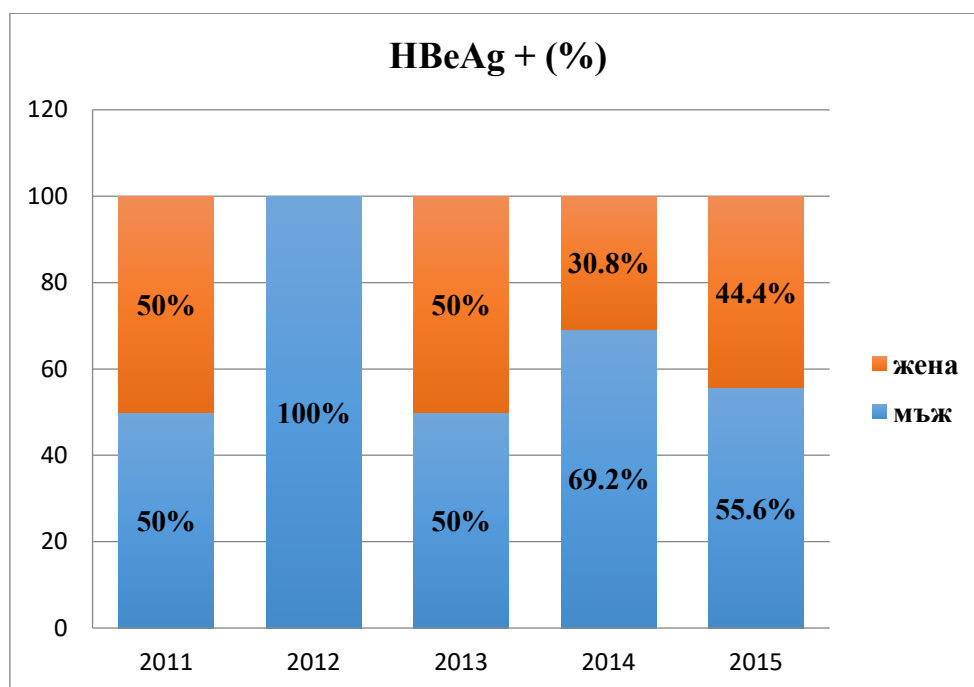
Възрастово и полово свързано разпространение на HBeAg

При анализа на резултатите от разпределението във възрастови интервали от 10 години, най-голяма честота положителни резултати наблюдавахме с два пика – във възрастов интервал 30 – 39 г., и 50 – 59 г. Във възрастта след 70 г., не регистрираме HBeAg положителни лица. Вероятно това отговаря на относителния дял на остра първична инфекция при лицата във възрастов диапазон 30 – 39 г., и/или на тези с активно HBV носителство в по-голямата възрастова група. При изследваните лица под 20-годишна възраст открихме един положителен резултат – 5.9% (95% CI: 0.1% - 28.7%, $n=1$) от всички изследвани в тази възрастова група. При лицата над 20 години положителни са 8.8% (95% CI: 83.8% – 99.9%, $n=31$) от изследваните (Табл. 10).

Таблица 10. Разпределение на изследваните лица под и над 20-годишна възраст

		Положителни		Отрицателни	
Възраст (години)	Под 20г.	брой	1	брой	16
		%	5.9%	%	94.1%
	Над 20г.	брой	31	брой	323
		%	8.8%	%	91.2%
Общо		брой	32	брой	339
		371	8.6%		91.4%

Разпределението на положителните лица в зависимост от пола показва много малки различия (Фиг. 10). Мъжки пол превалира по отношение на HBeAg положителните резултати – 65.6 % (95% CI: 46.8% – 81.4%, $n=21$) в сравнение с женски пол – 34.4% (95% CI: 18.6% – 53.2%, $n=11$).



Фигура 10. Разпределение на HBeAg положителните лица в зависимост от пола

Носителство на anti-HBe Ab в обща популация

В изследваната обща популация положителни данни за носителство на anti-HBe Ab е регистриран при 73.8% (95% CI: 69.1% – 78.2%, n=285) от изследваните 386 лица. Високият относителен дял anti-HBe Ab положителните според нас се дължи на факта, че лицата са изследвани насочено едновременно за HBeAg/Anti-HBe Ab поради други суспектни данни, или са проследявани амбулаторно поради данни за заразяване с HBV в миналото. Реално това са хора с други позитивни HBV маркери, най-често HBsAg и anti-HBc total Ab. Появата на анти-HBe антитела е отговор на имунната система към HBV и обикновено се съпътства със спад в нивото на HBV DNA и съответно на вирусната инфекциозност след остра инфекция. Сероконверсия на HBeAg към анти-HBe, съчетана с нормални чернодробни ензими, показващи цитолиза и намаляване на HBV DNA под 10^5 copies/mL има най-често благоприятно прогностично значение, защото е последица на намалена вирусна репликация. Неактивното носителство може да персистира през целия живот на човека, но известен процент от пациентите реактивират инфекцията с високи нива на HBV DNA, повишени стойности на ALT и евентуална прогресия до декомпенсирано чернодробно заболяване (Hsu HM et al., 2002; Lok AS 2007; Cornberg M et al., 2017).

Възрастово и полово свързано разпространение на anti-HBe Ab

При разпределението на изследваните лица във възрастови интервали от 10 години, получихме твърде неравномерни данни относно разпространението на позитивността по този серологичен маркер. Това вероятно се дължи на малкия брой изследвани лица в отделните възрастови групи и очертаващото се преимуществено насочено проследяване на хронични HBV носители от съответните специалисти. Нашите данни показват флукуиращ ход в относителните дялове на позитивните лица в отделните възрастови групи. Постепенно трайно нарастващ дял положителни лица откриваме след 40-годишна възраст.

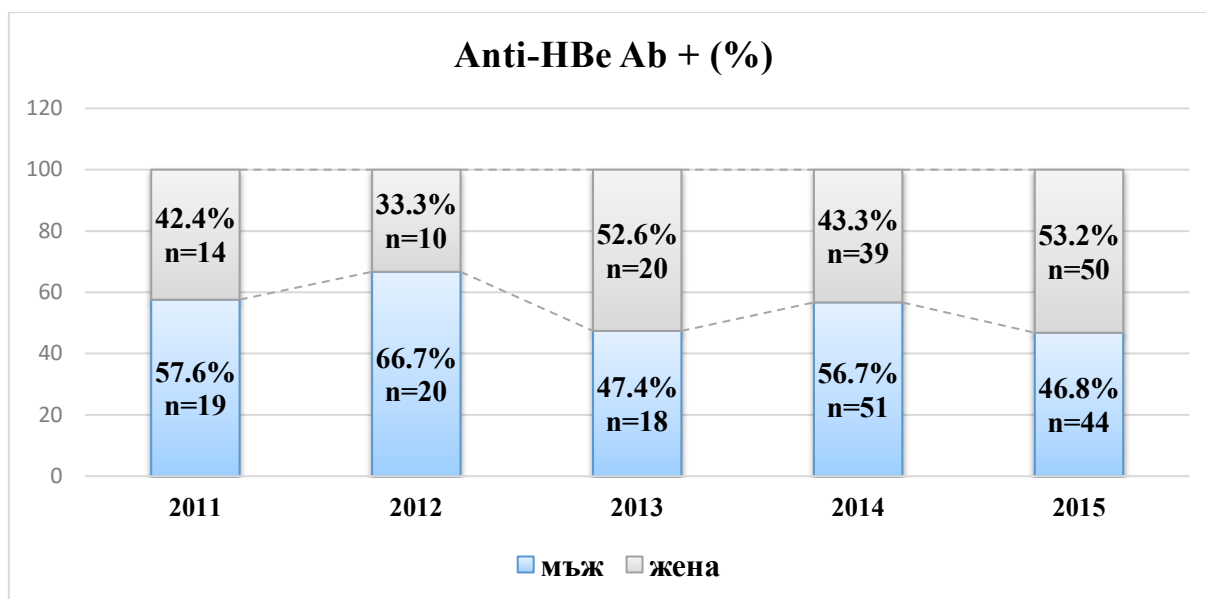
При сравнителен анализ на резултатите, установихме значително по-нисък относителен дял – 2.5% (95% CI: 1.0% – 5.0%, n=7) на положителните лица под 20 г., сравнено с общия брой anti-HBe Ab положителни. Anti-HBe Ab позитивните лица над 20-годишна възраст са 97.5% (95% CI: 93.6% – 98.3%, n=278) от всички положителни. От изследваните 14 лица под 20 г., anti-HBe Ab положителни са 50.0%, докато при тези над 20 г. – 74.7% (Табл.

11). При направен Хи-квадрат анализ между положителните резултати в двата възрастови интервала откриваме статистически значима разлика ($X^2= 4.46$; $p=0.02$), Това разпределение потвърждава преимущественото заразяване с HBV по хоризонталния път в средна възраст. Пожизненото носителство на anti-HBe Ab, отразява и относителния дял на хроничните и безсимптомни неактивни носители на инфекцията при лицата в по-напреднала възраст (над 50 години).

Таблица 11. Сравнително разпределение на anti-HBe Ab изследваните лица под и над 20-годишна възраст

			Anti-HBe Ab	
			Положителни	Отрицателни
Възраст (години)	Под 20г.	брой	7	7
		%	50.0%	50.0%
	Над 20г.	брой	278	94
		%	74.7%	25.3%
Общо		брой	285	101
		368	73.8%	26.2%

При разпределение на лицата в зависимост от пола и anti-HBe Ab позитивността установихме незначително превалиране на anti-HBe Ab положителните мъже – 53.3% (95% CI:47.4% – 57.2%, $n=152$), в сравнение с това на жените – 46.7% (95% CI:40.8% – 52.6%, $n=133$) (Фиг. 11). През наблюдавания период установихме увеличаване на относителния дял на позитивните лица при двата пола, с незначителен превес на жените през 2013 и 2015 г.



Фигура 11. Разпределение на anti-HBe Ab положителни лица в зависимост от пола

Нашите данни показват разпространението на хроничните носители на HBV инфекцията в напреднала възраст и положителните резултати от приложението на масовата имунизация при по-младото поколение.

Според докладваните от нас данни Североизточна България остава в зоната на средна ендемичност, където 2% – 7% от населението са носителите на HBsAg, а маркери за HBV инфекция се доказват при 20% – 60% от населението (WHO, 2015). Според обобщени данни за периода 2011 – 2015 г., относителният дял на носителството на HBsAg е 2.80%, ($n=8380$) и бележи спад в разпространението в сравнение с предходни проучвания. Според

разпространението на този HBV маркер Североизточна България попада в зоната на ниска средна ендемичност. Маркери на HBV инфекцията – anti-HBc total Ab, Anti-HBs Ab, HBeAg, anti-HBe Ab, регистрираме общо при 25.8% (95% CI:23.8% – 27.8%, n=1883) от изследваните за съответния маркер лица. Нашите данни съвпадат с данните от мащабно мултицентрово проучване в България за периода 1999 – 2000 г. Според данните от проучването средното разпространение на поне един HBV маркер е 27.46%, като се включва и разпространението на HBsAg. За Варна носителството е 25.4%, за Плевен – 30.92%, за Стара Загора – 23.45%, за Пловдив – 36.39%. Относителният дял на носителите на поне един HBV маркер е най-нисък в София – 17.76%, което е очаквано предвид факта, че столицата попада в зона на ниска за HBV ендемичност (1.9%) (Kevorkyan A. et al., 2015) според по-нови данни. В настоящия раздел представяме обобщени данни за разпространението на маркерите на HBV инфекцията в зависимост от установените серологични профили и комбинации, съотнесени към съответния брой изследвани лица (Табл. 12).

Таблица 12. Относителен дял и брой на изследваните HBV серопрофили

	Брой (n)	%	CI
HbsAg (+)/anti-HBc total (+)	59 от 617	9.6%	(7.4% – 12.2%)
Anti-HBs (+)/Anti-HBc total (+)	72 от 617	11.7%	(9.2% – 14.5%)
HbsAg (+)/HbeAg (+)	6 от 371	1.6%	(0.6% – 3.5%)
HbsAg (+)/Anti-Hbe (+)	75 от 386	19.4%	(15.6% – 23.7%)
HbeAg (-)/Anti-Hbe (+)	181 от 386	46.9%	(41.8% – 52.0%)

В комбинация HBsAg положителен/anti-HBc total, положителен резултати регистрирахме при 59 от изследваните в двата маркера лица – 9.6% (95% CI: 7.4% – 12.2%). Този вариант съответства на серологичен профил „настояща HBV инфекция“, с прогресия към хронична. Предходни данни за Варненски регион от периода 1998 – 2000 г., показват едновременно носителство на двата маркера в 4.94% от изследваните случайно подбрани лица (Русев В и съавт., 2003). По-високият относителен дял на разпространение на двата маркера в нашето проучване може да се обясни с непрекъснато повишаване относителният дял на anti-HBc total положителни лица в обща популация след 40-годишна възраст. Освен това средната възраст на нашата таргетна група е 43.14%, която съответства на периода на най-често доказваната позитивност за HBsAg в проучването. Данните се потвърждават и в комбинираното изследване за носителство на маркер anti-HBc total. Тежестта на хепатитната В вирусна инфекция и последователните фази в нейното развитие зависят от стадия на репликация на вируса и ответната прогресия, спиране, или регресия на морфологичните изменения в чернодробните клетки и мезенхима. При 80% – 90% от болните с остра инфекция HBsAg се негативира напълно най-късно след 3 до 4 месеца от началото на заболяването (Попов Р и съавт., 2012). Неговата персистенция след 6-ти месец се счита белег на „носителство на HBsAg“. Давността и тежестта на инфекцията в тези случаи може да се определи с допълнителни изследвания – доказване на HBeAg, anti-HBcIgM, HBV DNA PCR.

Едновременното носителство на anti-HBs Ab и anti-HBc total доказваме при 11.7% от всички индивиди изследвани за anti-HBc total (95% CI:9.2% – 14.5%, n=72). Тези данни ни доближават до данни намерените в литературата, като Русев В и съавт (2003) цитират 12.84% (322/2508) относителен дял на едновременното разпространение на двата серологични маркера. Трябва да се отбележи, че реалният дял на тази комбинация маркери вероятно е по-висок, предвид факта, че не са изследвани всички 8380 лица, обсъдени в тази глава от дисертационния труд. Комбинацията anti-HBs Ab/anti-HBc total дефинира процентното разпределение на лицата от обща популация, изложени в миналото на въздействието на HBV и придобили продължителен имунитет..

При малък брой HBsAg позитивни пациенти – 1.6% (95% CI:0.6% – 3.5%, n=6), открихме данни за активност на HBV инфекцията (HBeAg позитивност). В тези случаи вероятно става дума за ранна фаза на остра инфекция или фаза на имуноен толеранс (имунотолерантна фаза) на хронична HBV инфекция. Разграничаването на двете възможности може да се направи с по-подробни лабораторни и морфологични изследвания, повече анамнестични данни, с които не разполагаме. Освен това не всички лица са изследвани едновременно за двата маркера. При такива лица нивото на вирусната репликация е високо и може да се докаже с молекулярно-биологично изследване и количествено определяне на серумната HBV DNA. В началните стадии обикновено липсват клинични симптоми, не се открива фиброза, но тя прогресира бавно. Допуска се, че присъствието на двата маркера придава статут на имунологичен толеранс след заразяване в млада възраст. Тази фаза е по-често срещана и по-продължителна при пациенти заразени перинатално или в първата година от живота. Поради високото ниво на вiremия тези пациенти са силно заразени.

Процесът на протичане на хроничния В хепатит е динамичен. Естественият ход може да се раздели в пет фази, които не е задължително да са последователни (Yim J et al., 2005; EASL 2017). При нашите HBsAg позитивни/Anti-HBe анти тяло позитивни лица – 19.5% (95% CI:15.6% – 23.7%, n=75), най-вероятно се касае за преминаване в имунна активна фаза на хепатит В вирусната инфекция. Според литературата морфологично и клинично се проявява като хроничен хепатит с различна тежест в 24% – 63% от случаите, и по-рядко – като установена чернодробна цироза в 10 % – 24% от случаите (Di Marco V et al., 1999). Тази фаза може да продължи от няколко седмици до няколко години. Често се открива няколко години след фазата на имунния толеранс на хроничната HBV инфекция и до нея достигат предимно пациенти инфектирани в зряла възраст.

В нашето проучване най-голям относителен дял имат лицата със серологичен профил HBeAg негативен/Anti-HBe позитивен – 46.9% (95% CI:41.8% – 52.0%, n=181). Тази фаза е дефинирана като „фаза на неактивно HBV носителство“. Счита се, че HBeAg негативната хронична HBV инфекция представлява късна фаза в естествения ход на хроничната HBV инфекция, тъй като продължителни изследвания са отбелязали натрупващи се инциденти на HBeAg негативни мутанти след спонтанна HBeAg сероконверсия при пациенти с хроничен вирусен хепатит В (Alexoroulou A et al., 2014). Понякога е трудно да се различат истинските неактивни HBV носители от пациентите с активен HBeAg негативен хроничен В вирусен хепатит. HBeAg негативната хронична инфекция е по-агресивна, с напреднал хистологичен болестен процес в >50% от пациентите в сравнение с HBeAg позитивната хронична инфекция, предизвикана от дивия тип HBV и се асоциира с нисък процент на продължителна, спонтанна ремисия на заболяването (Hadziyannis SJ, 2007). При направени изследвания е установено, че при началната си презентация 29% – 38% от HBeAg негативните пациенти с хронична HBV инфекция вече са имали цироза на черния дроб, което ние не можем да потвърдим или отхвърлим предвид ограничено серологичния тренд на изследването. При този тип хроничен В хепатит често се развива хепатоцелуларен карцином (Nathanson N et al., 2007).

4.2. Проучване на етиологичната връзка с HBV и HDV при пациенти с хронични чернодробни заболявания

4.2.1. Установяване на разпространението на серологичните маркери за хепатит В и D вирусна инфекция при пациенти с хронични чернодробни заболявания

Описание на извадката

Настоящото проучване е проведено в два етапа: ретроспективно проучване на 503 единични серумни проби в периода 2013 – 2015 г., и проспективно проучване в периода 2016 – 2018 г. на 553 допълнителни серумни проби. За целия период на наблюдение (2013 – 2018 г.) са изследвани общо 1056 серумни проби на пациенти на УМБАЛ „Св.Марина“ – Варна,

Клиника по хепатогастроентерология. Всички пациенти са с клинични и лабораторни данни за чернодробно заболяване във възрастов диапазон 21 – 86 г. За уточняване относителният дял на пациентите с хронична HBV инфекция в Североизточна България са изследвани следните серологични маркери: HBsAg, anti-HBc total Ab, HBeAg, anti-HBe Ab, anti-HBs Ab. Средната възраст на целевата група е 51.6 г. (SD± 14.37). Относителният дял на изследваните мъже е 65.9% (95% CI: 63.0% – 68.8%, n=696). Изследваните жени съставляват 34.1% (95% CI: 31.2% – 37.0%, n=360). Разпределението на пациентите в зависимост от клиничната диагноза е представено в Табл. 13. Пациентите с клинична диагноза хроничен хепатит В са 41.4% (95% CI: 38.4% – 44.4%, n=437) и имат най-голям относителен дял от всички изследвани, лицата с клинична диагноза чернодробна цироза са 38.4% (95% CI: 35.5% – 41.5%, n=406), с декомпенсирана чернодробна цироза – 1.4% (95% CI: 0.8% – 2.3%, n=15). Пациентите с крайна степен на чернодробно увреждане - чернодробен карцином съставляват 2.8% (95% CI: 1.9%-4.0%, n=30).

Таблица 13. Разпределение на изследваните серумни проби в зависимост от клиничната диагноза (n=1056)

Диагноза (общо)	Брой (n)	%
Хроничен В хепатит	430	40.7
Чернодробна цироза	406	38.4
Декомпенсирана чернодробна цироза	15	1.4
Чернодробна стеатоза	27	2.6
Чернодробна фиброза	12	1.1
Автоимунен хепатит	4	0.4
Етанолов хепатит	2	0.2
Хроничен хепатит С	42	4.0
Хепатоцелуларен карцином	30	2.8
Хроничен HBV и HDV хепатит	82	7.8
Хроничен HBV и HCV хепатит	6	0.6
Общо	1056	100.0

Резултати

HBsAg

В нашето проучване за носителство на HBsAg са изследвали 492 серумни проби, които съставляват 46.6% (95% CI: 43.5% – 49.7%, n=492) от включените пациенти с хронични чернодробни заболявания. HBsAg позитивните серумни проби са 116, което съставлява 23.6% (95% CI: 19.9% – 27.6%, n=116) от всички изследвани за HBsAg. Разпределението на изследваните пациенти и резултатите от тестването по години е представено в Табл. 14. Относителният дял на HBsAg позитивните пациенти с хронични чернодробни заболявания е значително по-висок от докладваните от нас данни за обща популация (2.80 % в сравнение – 23.6%).

Таблица 14. Разпределение на HBsAg изследваните пациенти в периода 2013 – 2018 г.

Година/Маркер	Брой (n)	Относителен дял %
2013		
➤ HBsAg(+)	20/86	23.3%
➤ HBsAg(-)	66/86	76.7%
➤ Общо от всички изследвани за HBsAg	86/492	17.5%
2014		
➤ HBsAg(+)	27/76	35.5%
➤ HBsAg(-)	49/76	64.5%
➤ Общо от всички изследвани за HBsAg	76/492	15.4%
2015		
➤ HBsAg(+)	17/56	30.4%
➤ HBsAg(-)	39/56	69.6%
➤ Общо от всички изследвани за HBsAg	56/492	11.4%
2016		
➤ HBsAg(+)	22/121	18.2%
➤ HBsAg(-)	99/121	81.8%
➤ Общо от всички изследвани за HBsAg	121/492	24.6%
2017		
➤ HBsAg(+)	29/148	19.6%
➤ HBsAg(-)	119/148	80.4%
➤ Общо от всички изследвани за HBsAg	148/492	30.1%
2018		
➤ HBsAg(+)	1/5	20.0%
➤ HBsAg(-)	4/5	80.0%
➤ Общо от всички изследвани за HBsAg	5/492	1.0%
Общо:	492	100%
➤ BsAg(+)	116/492	23.6%
➤ HBsAg(-)	376/492	76.4%

Възрастова и полово свързана характеристика на HBsAg в популацията с хронични чернодробни заболявания

При разпределяне на изследваните пациенти с хронични чернодробни заболявания в 7 възрастови групи през интервали от 10 години установихме най-малък относителен дял на HBsAg позитивни лица във възрастова група до 28 г. – 15.8%, и над 79 г. – 5.9% (95% CI: 0.1% – 28.7%), а най-висок – във възрастовия интервал от 29 до 38 г. – 28.4% (95% CI: 17.6% – 39.2%). Във възрастов интервал 29 – 68 г., относителният дял на положителните пациенти се запазва в близки стойности. При разпределение на пациентите в зависимост от пола установихме по-висок относителен дял позитивни мъже – 71.6% (95% CI: 69.4% – 79.5%, n=83) в сравнение с позитивните жени – 28.4% (95% CI: 20.5% – 37.6%, n=33).

Anti-HBc total Ab

Маркерът anti-HBc total Ab е изследван при 527 пациенти с хронични чернодробни заболявания, които съставляват 49.4% (95% CI: 46.8% – 53.0%, n=527) от всички включени в проучването. Положителен резултат получихме общо при 277 от тях, което съставлява 52.6% от изследваните за този серологичен маркер (95% CI: 48.2% – 56.9%). Разпределението на изследваните и резултатите от определянето на anti-HBc total по години е представено в Табл. 15. Резултатите показват по-висок относителен дял на позитивните в сравнение с този, получен от нас в обща популация (42.3%). Въпреки, че изследваните популации са различни и са изследвани в различен времеви интервал, доминирането на anti-HBc total антитяло

позитивните резултати при лицата с хронично чернодробно заболяване според нашите данни е очевидно.

Таблица 15. Разпределение на anti-HBc total Ab тестваните пациенти в периода 2013 – 2018 г.

Година/Маркер	Брой (n)	Относителен дял%
2013		
➤ Anti-HBc total Ab(+)	52/96	54.2%
➤ Anti-HBc total Ab (-)	44/96	45.8%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBc total Ab	96/527	18.2%
2014		
➤ Anti-HBc total Ab (+)	55/79	69.6%
➤ Anti-HBc total Ab (-)	24/79	30.4%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBc total Ab	79/527	15.0%
2015		
➤ Anti-HBc total Ab (+)	33/49	67.3%
➤ Anti-HBc total Ab (-)	16/49	32.7%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBc total Ab	49/527	9.3%
2016		
➤ Anti-HBc total Ab (+)	69/124	55.6%
➤ Anti-HBc total Ab (-)	55/124	44.4%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBc total Ab	124/527	23.5%
2017		
➤ Anti-HBc total Ab (+)	64/139	46.0%
➤ Anti-HBc total Ab (-)	75/139	54.0%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBc total Ab	139/527	26.4%
2018		
➤ Anti-HBc total Ab (+)	4/40	10.0%
➤ Anti-HBc total Ab (-)	36/40	90.0%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBc total Ab	40/527	7.6%
Общо:	527	100%
➤ Anti-HBc total Ab (+)	277/527	52.6%
➤ Anti-HBc total Ab (-)	250/527	47.4%

Възрастова и полово свързана характеристика в разпространението на anti-HBc total Ab при пациентите с хронично чернодробно заболяване

При разпределяне на изследваните пациенти с хронични чернодробни заболявания в 7 възрастови групи през интервали от 10 години установихме най-нисък относителен дял позитивни пациенти във възрастова група 18 – 28 г. – 26.3% (95% CI: 9.1% – 51.9%), а най-висок – във възрастов интервал 49 – 58 г. – 72.4% (95% CI: 63.3% – 80.3%), както и 69 – 78 г. – 59.4% (95% CI: 48.2% – 56.9%) При сравняване на anti-HBc total Ab положителните пациенти във възрастов диапазон 18 – 28 г., с тези в останалите възрастови групи в Хи-квадрат тест установихме статистически значима разлика между възрастта на изследваните лица и anti-HBc total Ab положителните резултати ($\chi^2=5.44$, $p=0.01 < 0.05$).

При разпределението на anti-HBc total Ab позитивните пациенти в зависимост от пола установихме по-висок относителен дял позитивни мъже – 65.7% (95% CI: 59.8% – 78.3%, $n=182$) в сравнение с този на жените – 34.3% (95% CI: 28.7% – 40.2%, $n=95$).

Anti-HBs Ab

Тестваните за маркер anti-HBs Ab серумни проби съставляват 8.0% (95% CI: 6.4% – 9.8%, n=84) от всички пациенти с хронични чернодробни заболявания. Разпределението по години е представено в Табл. 16. Броят на позитивните anti-HBs Ab единични серумни проби (anti-HBs Ab >10 mIU/mL) е 18, което съставлява 40.0% (95% CI: 25.7% – 55.7%, n=18) от изследваните. Относителният дял на позитивните пациенти с хронични чернодробни заболявания е по-нисък в сравнение с данните, получени в обща популация (40.0% срещу 49.1%). По-голямата част от пациентите с хронични чернодробни заболявания са в стадий на хронична активна инфекция, с вирусна репликация или в несигурно възстановяване от инфекция. Те или не образуват протективни anti-HBs Ab, или ги образуват в много ниски титри, и се считат потенциално инфекциозни.

Таблица 16. Разпределение на anti-HBs Ab изследваните пациенти в периода 2013 – 2018

2.

Година/Маркер	Брой (n)	Относителен дял%
2013		
➤ Anti-HBs Ab(+)	3/7	42.9%
➤ Anti-HBs Ab (-)	4/7	57.1%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBs Ab	7/45	8.3%
2014		
➤ Anti-HBs Ab (+)	2/5	40.0%
➤ Anti-HBs Ab (-)	3/5	60.0%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBs Ab	5/45	6.0%
2015		
➤ Anti-HBs Ab (+)	1/3	33.3%
➤ Anti-HBs Ab (-)	2/3	66.7%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBs Ab	3/45	3.6%
2016		
➤ Anti-HBs Ab (+)	2/6	33.3%
➤ Anti-HBs Ab (-)	4/6	66.7%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBs Ab	6/45	7.1%
2017		
➤ Anti-HBs Ab (+)	10/23	43.5%
➤ Anti-HBs Ab (-)	13/23	56.5%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBs Ab	23/45	27.4%
2018		
➤ Anti-HBs Ab (+)	0	0.0%
➤ Anti-HBs Ab (-)	1/1	100.0%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBs Ab	1/45	2.2%
Общо:	45	100%
➤ Anti-HBs Ab (+)	18/45	40.0%
➤ Anti-HBs Ab (-)	27/45	60.0%

Възrastова и полово свързана характеристика в разпространението на anti-HBs Ab при пациентите с хронични чернодробни заболявания

За положителни anti-HBs Ab резултати се приемат стойности над 10 mIU/mL. Нашите данни са получени въз основа на малка група изследвани пациенти. Във възрастов диапазон 18 – 28 г. е изследван само един пациент, който е anti-HBs Ab позитивен – 5.6% (95% CI: 15.2%

– 72.3%, n=1), от всички anti-HBs Ab положителни лица и 100% от изследваните в групата. Във възрастова група 69 – 78 г. са изследвани най-много от пациентите (n=12). Относителният дял на положителните е 41.7% (95% CI: 15.2% – 72.3%), от всички изследвани в тази възрастова група. Най-малко anti-HBs Ab позитивните резултати установихме във възрастова група 49 – 58 г. – 33.3%. В останалите възрастови групи процентът на anti-HBs Ab позитивните пациенти е в диапазон 20.0% – 44.4%.

При разпределението на изследваните пациенти в зависимост от пола установихме, че от изследваните жени, относителният дял на anti-HBs Ab позитивните е 61.1% (95% CI: 35.7% – 82.7%, n=11). От изследваните мъже, относителният дял на anti-HBs Ab позитивните е 38.9% (95% CI: 17.3% – 64.3%, n=7). Единствено по този маркер на хепатит В вирусната инфекция, относителният дял на позитивните жени е по-висок от този на мъжете както това беше установено в обща популация, така и при пациентите с хронични чернодробни заболявания. Разликата по пол не е статистически значима ($\chi^2=2.11$, $p=0.63 >0.05$).

HBeAg

Серологичен маркер HBeAg е определян на 389 серумни проби от пациенти с хронични чернодробни заболявания. Разпределението на пациентите и резултатите от изследването по години са представени в Табл. 17.

Таблица 17. Разпределение на HBeAg изследваните пациенти в периода 2013 – 2018 г.

Година/Маркер	Брой (n)	Относителен дял%
2013		
➤ HBeAg(+)	13/104	12.5%
➤ HBeAg(-)	91/104	87.5%
➤ Общо от всички изследвани за HBeAg	104/389	26.7%
2014		
➤ HBeAg(+)	3/51	5.9%
➤ HBeAg(-)	48/51	94.1%
➤ Общо от всички изследвани за HBeAg	51/389	13.1%
2015		
➤ HBeAg(+)	33/49	67.3%
➤ HBeAg(-)	16/49	32.7%
➤ Общо от всички изследвани за HBeAg	49/389	12.6%
2016		
➤ HBeAg(+)	23/73	31.5%
➤ HBeAg(-)	50/73	68.5%
➤ Общо от всички изследвани за HBeAg	73/389	19.3%
2017		
➤ HBeAg(+)	20/82	24.4%
➤ HBeAg(-)	62/82	75.6%
➤ Общо от всички изследвани за HBeAg	82/389	21.1%
2018		
➤ HBeAg(+)	3/30	10.0%
➤ HBeAg(-)	27/30	90.0%
➤ Общо от всички изследвани за HBeAg	30/389	7.7%
Общо:	389	100%
➤ HBeAg(+)	95/389	24.4%
➤ HBeAg(-)	294/389	75.6%

HBeAg позитивни са 24.4% (95% CI: 20.2% – 29.0%, n=95). Получените резултати при пациентите с клинична диагноза хронично чернодробно заболяване е значително по-висок от

този, установен от нас в обща популация (8.6%). Едновременно наличие на HBsAg(+) и HBeAg(+), откриваме при 3-ма пациента, мъже – 2.6% (95% CI: 0.5% – 7.4%, n=3). Правим уточнението, че не всички лица, включени в проучването са изследвани едновременно за двата маркера. Хи-квадрат анализът потвърди по-високия относителен дял на HBeAg положителните в популацията на пациентите с хронични чернодробни заболявания в сравнение с HBeAg позитивните лица в обща популация, като се установи и статистически значима разлика ($\chi^2=34.04$, $p<0.001$).

Възrastова и полово свързана характеристика на носителството на HBeAg при пациентите с хронични чернодробни заболявания

Според нашите данни най-нисък относителен дял HBeAg позитивни пациенти има във възрастова група 18 – 28 г. – 15.4% (95% CI: 25.6% – 57.9%, n=6), а най-висок – във възрастовия интервал 49 – 58 г. – 32.1% (95% CI: 23.6% – 41.6%, n=36), като нарастването на относителния дял на позитивните започва във възрастов диапазон 39 – 48 г. В останалите възрастови групи процента на HBeAg позитивните пациенти е в диапазон 19.5% – 28.8%.

В групата на изследваните пациенти преобладават мъжете (n=264), като относителният дял на HBeAg позитивните е 71.6% (95% CI: 61.4% – 80.4%, n=68), а изследваните жени (n=125) са с относителен дял на HBeAg позитивност в 28.4% (95% CI: 19.6% – 38.6%, n=27) от всички HBeAg положителни лица.

Anti-HBe Ab

За доказване на anti-HBe Ab са тествани 402 проби. Това съставлява 38.1% (95% CI: 35.1% – 41.1%, n= 402) от всички пациенти с хронични чернодробни заболявания. Получените резултати по години са представени в Табл. 18. Относителният дял на anti-HBe Ab позитивните серумни проби е 79.6% (95% CI: 75.3% – 83.4%, n=320). Относителният дял на позитивните пациенти е по-висок от този, получен от нас в обща популация (79.6% срещу 73.8%), но резултатите не се различават съществено. Това според нас се дължи на факта, че лицата в двете популации са изследвани насочено едновременно за HBeAg /anti-HBe Ab поради раздвижени серумни трансминази и реално това са хора с други позитивни HBV маркери, най-често HBsAg и/или anti-HBc total Ab.

Таблица 18. Разпределение на anti-HBe Ab изследваните пациенти в периода 2013 – 2018 г.

Година/Маркер	Брой (n)	Относителен дял%
2013		
➤ Anti-HBe Ab(+)	102/111	91.9%
➤ Anti-HBe Ab (-)	9/111	8.1%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBe Ab	111/402	27.6%
2014		
➤ Anti-HBe Ab (+)	46/51	90.2%
➤ Anti-HBe Ab (-)	5/51	9.8%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBe Ab	51/402	12.7%
2015		
➤ Anti-HBe Ab (+)	29/31	93.5%
➤ Anti-HBe Ab (-)	2/31	6.5%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBe Ab	31/402	7.7%
2016		
➤ Anti-HBe Ab (+)	49/72	68.1%
➤ Anti-HBe Ab (-)	23/72	31.9%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBe Ab	72/402	17.9%

2017		
➤ Anti-HBe Ab (+)	69/82	84.1%
➤ Anti-HBe Ab (-)	13/82	15.9%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBe Ab	82/402	20.4%
2018		
➤ Anti-HBe Ab (+)	25/30	83.3%
➤ Anti-HBe Ab (-)	5/30	16.7%
➤ Общо от всички изследвани за anti-HBe Ab	30/402	7.5%
Общо:	402	100%
➤ Anti-HBe Ab (+)	320/402	79.6%
➤ Anti-HBe Ab (-)	82/402	20.4%

Възrastова и полово свързана характеристика на носителството на anti-HBe Ab при пациентите с хронични чернодробни заболявания

Според нашите данни, най-нисък относителен дял на anti-HBe Ab позитивни пациенти има във възрастта над 79 г. – 42.9% (95% CI: 9.9% – 81.6%), а най-висок – във възрастови интервали 49 – 58 г. и 59 г. – 68 г. – 90.5%, както това установихме и при изследване за носителство на anti-HBe total. Най-голям брой изследвани пациенти има във възрастов диапазон 49 – 58 г. – 25.6% (95% CI: 21.4% – 30.2%, n=103). В останалите възрастови групи относителният дял на anti-HBe Ab позитивните е в диапазон 81.8% – 90.3%, като започва да нараства още в младежка възраст – 29 – 38 г. Разликата е статистически значима при сравняване на относителните дялове позитивност във възрастовите диапазони 18 – 28 г. и над 79 г. с останалите възрастови групи ($\chi^2=6.81$, $p=0.03 < 0.05$).

При разпределение на anti-HBe Ab изследваните пациенти в зависимост от пола регистрирахме по-голям брой изследвани мъже, с относителен дял anti-HBe Ab позитивни в 68.8% (95% CI :63.4% – 73.8%, n=220). Положителните жени са с относителен дял 31.3% (95% CI: 26.2% – 36.6%, n=100) от всички anti-Be Ab положителни.

Възrastова и полово свързана характеристика на разпространението на серологичните маркери на HBV инфекцията при пациентите с хронични чернодробни заболявания

Разпределението на всички изследвани пациенти за маркерите на HBV инфекция с хронични чернодробни заболявания в зависимост от възрастта и пола е представено в Табл. 19.

Таблица 19. Разпределение на пациентите в зависимост от възрастта и пола

Възrastова група	Пол		Общ брой(n)	Относителен дял %, (95%CI)
	Мъж	Жена		
18 – 28 г.	40	22	62	5.9% (4.5% – 7.5%)
29 – 38 г.	125	38	163	15.4% (13.3% – 17.8%)
39 – 48 г.	128	60	188	17.8% (15.5% – 20.2%)
49 – 58 г.	200	107	307	29.1% (26.3% – 31.9%)
59 – 68 г.	145	82	227	21.5% (19.1% – 24.1%)
69 – 78 г.	48	36	84	8.0% (6.4% – 9.8%)
Над 79 г.	10	15	25	2.4% (1.5% – 3.5%)
Общо	696	360	1056	100%

Нашите резултати показаха, че изследваните пациенти с хронични чернодробни заболявания са преимуществено са във възрастов диапазон 29 – 68 г., съответно 83.8% (95% CI: 81.4% – 86.0%, n= 885). Най-висок е дялът на изследваните пациенти във възрастов

диапазон 49 – 58 г. – 29.1% (95% CI: 26.3% – 31.9%, n=307). Изследваните мъже са 65.1% (95% CI: 59.5% – 70.5%, n=200). Изследваните жени са 34.9% (95% CI: 29.5% – 40.9%, n= 107). Възрастовата група, в която попадат най-малко пациенти от двата пола е над 79 г. – 2.4% (95% CI: 1.5% – 3.5%, n= 25). Тази възрастова група е единствена, в която жените са повече от изследваните мъже – 60% (95% CI: 38.7% – 78.9%, n=15) и 40% (95% CI: 21.1% – 61.3%, n= 10) съответно.

Обсъждане

Според изнесените от нас данни в популацията на пациентите с чернодробни заболявания преобладават тези с хроничен хепатит В и чернодробна цироза. Според носителството на HBsAg етологична връзка с HBV открихме в 23.6% от изследваните. В сравнение с предходни проучвания проведени при пациенти с хронични чернодробни заболявания в Североизточна България- 30.4% (Ivanova L, et al., 2007), както и 26.5% (Иванова Л и съавт., 2011), този процент е по-нисък, което потвърждава тенденцията за постепенно намаляване на заболяемостта от хепатит В. Важността на проблема се определя именно от възможните усложнения при тази инфекция – хронифициране в 5% – 10% от симптоматичните случаи на остър хепатит В, чернодробна фиброза и цироза, НСС. HBV DNA в хепатоцитите съществува като интегрирана (двойно верижна, интрануклеарна) форма или като епизомална (свободна, циркулярна, с ниско молекулно тегло, едноврещна, вътречитоплазмена) форма (Mason WS et al., 2016). И двете форми могат да се намират в един и същи хепатоцит. Интеграционният процес лежи в основата на антигено носителството, хроничното персистиращо носителство, хепатитната В вирусна цироза и е главна причина за възникването на хепатоцелуларния карцином.

Анализирайки възрастовото разпространение на хроничната хепатит В вирусна инфекция, установихме по-ниска честота под 20-годишна възраст. Според литературата най-голям брой инфектирани се откриват в средна възрастова група 40 – 49 г. (Chen CL, et al., 2015). Нашите данни са близки до тези, средно във възрастов диапазон 39 г. – 58 г. Тези данни потвърждават ефективността на ваксинацията за новородените и малките деца. Натрупването на рискови експозиции с напредване на възрастта и включване на половите контакти, обуславят хоризонталната трансмисия на вируса и хронифициране на инфекцията.

По отношение на белега пол и относителен дял на разпространение на маркерите на хепатит В при пациенти с хронични чернодробни заболявания, нашите данни показват, че мъжки пол превалява при всички маркери – HBsAg, anti-HBc total, HBeAg, anti-HBe Ab, с изключение на anti-HBs Ab, където положителните жени са с по-голям дял от мъжете. Нашите данни съвпадат с тези от литературата за преваляване на HBV инфекцията при лицата от мъжки пол (Као HJ et al., 2000). Според данни на някои автори, HBsAg позитивността при мъжете е 68.15% и 31.15 % при жените (Naugler WE et al. 2007). Merrill R et al. (2011) и Allain JP et al. (2012) също установяват по-висок дял на разпространение на инфекцията при мъжете, в сравнение с жените (59.1%/40.9% и 58.3%/ 41.7% съответно). При проучване на деца с хронично чернодробно заболяване също е установена (Zampino R et al., 2015) по-висока честота (54%) на разпространение на HBV при момчетата, в сравнение с тази при момичетата (46%).

Все по-широко се обсъжда ролята на хормонът естроген в развитието както на хронична хепатит В вирусна инфекция, така и на нейните усложнения – фиброза, чернодробна цироза и НСС. При проучване (Tanaka Y et al., 2016) е установено, че множество естрогенни рецептори (ER) се експресират на повърхността на черния дроб при мъжете, което води до загуба на естрогенна чувствителност. Според авторите на проучването, на това се дължи до голяма степен предоминирането на хроничната хепатит В вирусна инфекция и чернодробна цироза при мъжете и при част от жените в постменопауза, с изключение на автоимунните чернодробни заболявания.

Нашите данни при изследване наличието на anti-HBs Ab при пациентите с хронични чернодробни заболявания показаха по-голям относителен дял на положителните жени, в

сравнение с мъжете. Това е в унисон с литературните данни, според които жените образуват по-мощни имунни отговори на антигенни стимули при ваксиниране и/или заразяване, отколкото мъжете (Klein SL, et al., 2010). Известно е, че сексуалният диморфизъм е регистриран в човешки и животински модели (Rogers G et al., 2010).

4.2.2. Установяване на относителния дял на едновременно инфектираните с HBV и HDV пациенти с хронични чернодробни заболявания

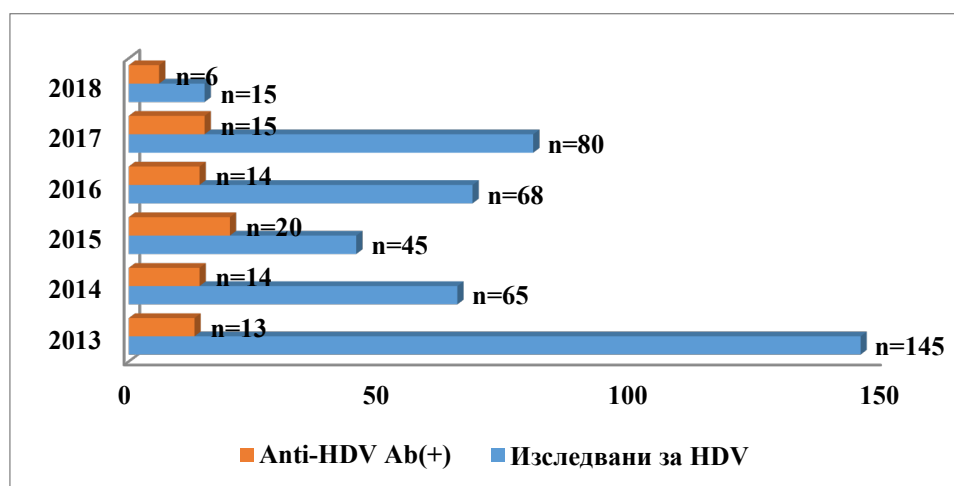
Целта на това изследване е да установим относителния дял на пациентите с клинични данни за хронично чернодробно заболяване, едновременно заразени с HBV и HDV в Североизточна България. Наличните данни не ни позволяват да правим ретроспективно изводи за начина на заразяване и вида на инфекцията (супер/коинфекция).

Описание на извадката

Изследвани са 418 серумни проби от 391 пациенти с хронични чернодробни заболявания с приложение на серологичния маркер anti-HDV Ab. От всички пациенти с чернодробни заболявания (n=1056) в нашето проучване, изследваните за anti-HDV Ab съставляват 39.6% (95% CI: 36.6% – 42.6%, n=418). Възрастовият диапазон на изследваните е 26 – 69 г. От анализа са изключени лицата, които не отговарят на критериите за включване, а именно без данни позволяващи статистическа обработка, както и тези с неопределен резултат в теста. При разпределението по време на проучвания период установихме най-малко изследвани през 2018 г. (n=15), а най-много през 2013 г. (n=145). Средната възраст на изследваните лица е 44.32 г. (SD±11.39)

Резултати

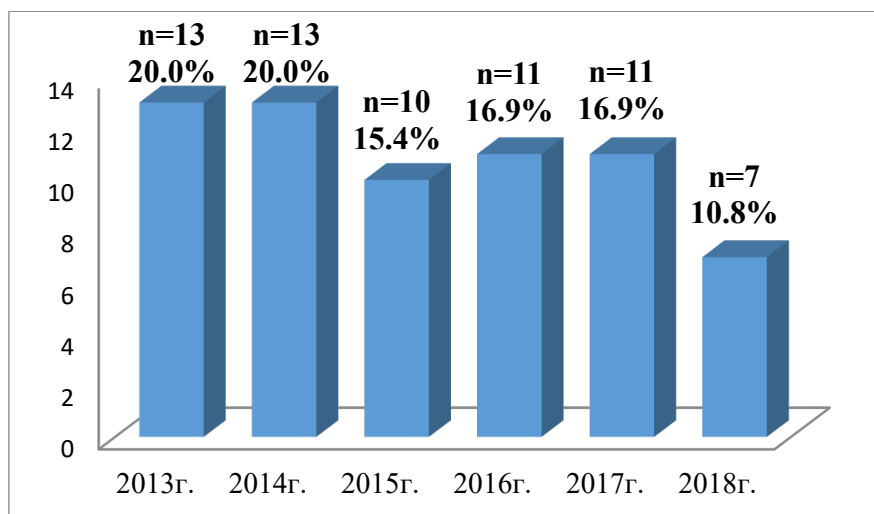
Разпределението на изследваните серумни проби по години е представено на Фиг. 12. През 2013 г. от изследваните 145 единични серумни проби anti-HDV положителни са 9.0% (95% CI: 4.9% – 14.8%, n=13). През 2014 г. от изследваните 82 серумни проби, положителни резултати регистрирахме в 21.5% (95% CI: 12.3% – 33.5%, n=14), през 2015 г., от 45 серумни проби, положителни са 44.4% (95% CI: 29.6% – 60.0%, n=20), през 2016 г. – 20.6% (95% CI: 11.7% – 32.1%, n=68), през 2017 г. – 18.8% (95% CI: 10.9% – 29.0%, n=80) и през 2018 г. – 40.0% (95% CI: 16.3% – 67.7%, n=15).



Фигура 12. Разпределение на изследваните серумни проби в зависимост от наличието на anti-HDV Ab в ELISA

От всички изследвани пациенти (n=391) с предварително доказано чернодробно заболяване, 16.6% (95% CI: 15.9% – 23.8%, n=65) имат етиологична връзка с HDV в ELISA. Разпределението на anti-HDV Ab (n=65) положителните пациенти по години за целия период на проучването е представено на Фиг. 13. През 2013 г. anti-HDV положителни са 20.0% (95%

CI: 11.1% – 31.8%, n=13) от всички положителни пациенти, през 2014 г. – 20.0% (95% CI: 11.1% – 31.8%, n=13), през 2015 г. – 15.4% (95% CI: 7.6% – 26.5%, n=10), през 2016 г. – 16.9% (95% CI: 8.8% – 28.3%, n=11), през 2017 г. – 16.9% (95% CI: 8.8% – 28.3%, n=11) и през 2018 г. – 10.8% (95% CI: 4.4% – 20.9%, n=7).



Фигура 13. Разпределение на HBV и HDV позитивните пациенти по години

Възrastова характеристика на изследваните anti-HDV Ab пациенти с хронични чернодробни заболявания

Анализът на резултатите показва най-висок относителен дял положителни пациенти във възрастов диапазон 29 – 38 г. – 25.4% (95% CI: 15.5% – 37.5%, n=17) и 39 – 48 г. – 20.6% (95% CI: 11.7% – 32.1%, n=14). Най-малко на брой HDV положителни резултати открихме във възрастта 18 – 28 г. – 6.3% (95% CI: 0.8% – 20.8%, n=2), както и над 68 г. – 4.0% (95% CI: 0.1% – 20.4%, n=1). По-високото разпространение на хепатит D при пациентите в по-млада и средна възраст 29 – 48 г. съвпада по относителен дял с този на HBsAg и HBeAg позитивността в нашето проучване и показва, че двойната инфекция се придобива преимуществено в по-млада възраст и предимно при лица с рискови контакти.

Сравнително високият относителен дял позитивни пациенти във възрастов диапазон 49 – 58 г. (17.1%), съответства на преимущественото разпространение на маркерите anti-HBc total Ab и anti-HBe Ab.

Полово свързана характеристика на изследваната за anti-HDV Ab популация

По отношение на разпределението по пол, броят на изследваните серумни проби на мъже (n=220), превалява над този на жените (n=171). По-високият процент при мъжете – 63.1% (95% CI: 50.2% – 74.7%, n=41) спрямо жените – 36.9% (95% CI: 25.3% – 49.8%, n=24) се запазва и при anti-HDV Ab положителните резултати. Разпределението на относителния дял на HDV позитивните в зависимост от пола е представено в Табл. 20.

Таблица 20. Разпределение на anti-HDVAb позитивните пациенти по пол

Пол	Anti-HDV Ab положителни	
	Anti-HDVAb(+)	Относителен дял %, (95%CI)
Мъж	41	63.1% (50.2% – 74.7%)
Жена	24	36.9% (25.3% – 49.8%)
Общо	65	100.0% (94.5% – 100.0%)

Обсъждане

Хепатит D вирусната инфекция е все още сериозен глобален проблем, засягащ 15 – 20 милиона индивиди по света (Rizzetto M, 2009; Wedemeyer H et al., 2010). Получените от нас резултати показват честота на разпространение на anti-HDV Ab в 16.6% от HBV инфектираните серумни проби на лица с хронични чернодробни заболявания. В други европейски страни (Букурещ, Румъния), едновременна HBV/HDV инфекция е открита при 20.4% от пациентите с хроничен хепатит В. Разпространението на хепатит D според различни проучвания на пациенти с хронични чернодробни заболявания показва вариабилност. Към днешна дата в световен мащаб липсва задълбочена и достоверна информация, освен базирана на единични проучвания. Според проучване в Северна Каролина (САЩ) през 2013 г. от 499 пациенти с хронична HBV инфекция, HDV положителни са 40 (8%) от тях (Gish et al., 2013).

През последните години, нови проучвания показват тенденция към увеличаване разпространението на хепатит D, особено сред емигрантското население. В голямо проспективно проучване в Гърция на 4 673 пациенти с хроничен хепатит В, от които 2137 изследвани за HDV, HBV/HDV позитивни резултати са получени в 4.2%. Значително по-голямо разпространение е установено сред емигрантите (7.5%), в сравнение с местното гръцко население (2.8%) (Manesis EK et al., 2013). Според друго проучване в източната част на Средиземноморието, 14.8% от асимптоматичните HbsAg позитивни пациенти са инфектирани с HDV, като чернодробната цироза се оказала често усложнение (Amini N et al., 2013). Сред 1 220 емигранти с хроничен хепатит от Екваториална Гвинея, живеещи в Испания, разпространението е в 20.9% (Popescu GA et al., 2013; Rivas P et al., 2013).

Хроничната HDV инфекция продължава да бъде значителен здравен проблем в Европа и честотата според други автори е 8% – 20% (Gheorghe L et al., 2015). В Турция серологични данни за anti-HDV позитивност са установени при 27.5% от пациенти с хроничен хепатит (Celen MK et al., 2006). В България първото проучване на 503 HBsAg положителни серумни проби за HDV инфекция при рискови контингенти в Северна България е проведено от Б. Илиев и сътр. през 1989 г. (Гъбев Е. и съавт. 2001). През 1998 г. същият автор съобщава, че от 1465 HBsAg позитивни серумни проби, 151 (10.3%) са положителни за делта инфекция. Най-висок е процентът на заразените хемофилици (47.06%), следвани от проституиращи жени, болни с остри и хронични хепатити и политрансфузирани пациенти.

Други данни за Североизточна България установяват етиологична връзка на HBV/HDV инфекцията в около 10% от пациентите с хронични чернодробни заболявания по серологични данни (Ivanova L et al., 2007; Иванова и съавт., 2011). Нашите данни показват по-висок относителен дял и по-голямо участие на HDV в етиологията на хроничните чернодробни заболявания. Те са сравними със средните за Европа и потвърждават тезата за по-висок относителен дял на HDV в някои южно и източно европейски държави и Средиземноморието.

Според възрастово свързаното разпределение на HDV носителството в нашето проучване най-голям относителен дял имат пациентите във възрастов диапазон 29 – 48 г., като разликата с останалите възрастови групи е статистически значима ($\chi^2=4.48$, $p=0.03<0.5$). Зависимостта на HDV от HBV определя множествения механизъм на неговото разпространение, с преобладаване на парентералния път. Заразяването става чрез контаминирана кръв или кръвни продукти, както и при интимен сексуален контакт (Hughes SA et al., 2011). При по-възрастните, натрупването на рискови експозиции, увеличава риска от заразяване, типично за зоните с интермедиерно разпространение на хепатит В, както това доказваме за пациентите с хронична HBV моноинфекция и едновременна инфекция с HDV във възрастов диапазон 49 – 58 г.

Не открихме статистически значима разлика при разпределение на пациентите в зависимост от пола и разпространението на anti-HDV Ab положителните ($p=0.22>0.05$). Въпреки това във всички години от провеждане на изследването, с изключение на 2017 година, преобладава мъжки пол. Подобни резултати са установени и от други автори, които не откриват корелация между пол, възраст, наличие на други серологични маркери на HBV инфекцията и anti-HDV Ab серопозитивността (Shaikh M et al., 2011; Rivas P et al., 2013; Saravanan S et al., 2013). По-

големият относителен дял на мъжете може да се обясни с вероятно по-рисково сексуално поведение, по-честа интравенозна употреба на наркотици, при живеещи във високоендемични райони, миграция от високо към средно и ниско ендемични региони (WHO, 2017).

4.2.3. Прилагане на молекулярно-биологични методи (Real-time PCR) за определяне вирусния товар на едновременно инфектираните (HBV и HDV) пациенти. Изследване на взаимодействието между двата вируса

Описание на извадката

За периода (2013 – 2018 г.) HDV RNA положителни резултати установихме при 63 от всички 65 anti-HDV Ab положителни пациенти (96.9%). Разпределението по пол показва 63.5% (95% CI: 50.4% – 75.3%, n=40) мъже и 36.5% (95% CI: 24.7% – 49.6%, n=23) жени, във възрастовия диапазон 24 – 68 г. Средна възраст на пациентите е 47.36 г. (SD±10.93).

От всички HDV RNA положителни пациенти на противовирусна терапия са 24 пациента, които съставляват 38.1% (95% CI: 26.1% – 51.2%, n=24) от показаните положителен резултат в Real-time PCR. Проследявани са през различни интервали по време на терапията, след определяне на стартовото ниво на вирусната RNA, като и след приключване на терапията.

От пациентите на антивирусна терапия мъжете са 58.3% (95% CI: 36.6% – 77.9%, n=14), а жените – 41.7% (95% CI: 22.1% – 63.4%, n=10). Всички пациенти са лекувани в Клиниката по хепатогастроентерология, а вирусологичните изследвания са извършени в Лабораторията по клинична вирусология и Лабораторията по клинична имунология на УМБАЛ „Св.Марина“ – Варна. Направена е съпътстваща оценка с биохимични и хистологични методи. Лабораторните показатели на пациентите са проследявани средно в 7.87 серумни проби от пациент (SD±3.18). Съпътстващо количествено определяне на вирусния товар (HBV ДНК) и (HDV РНК) е извършено на различни етапи от провежданата терапия. На част от пациентите са направени функционални изследвания (чернодробна биопсия), с цел оценка на чернодробната функция и определяне на прогностичната преживяемост. Всички пациенти (n=24) са HBsAg позитивни, anti-HBc total Ab позитивни, anti-HDV Ab позитивни. Двадесет и трима от пациентите са HBeAg отрицателни 95.8% (95% CI: 78.9% – 99.9%, n=23), един пациент е с HBeAg сероконверсия и последваща реверсия към HBeAg положителен резултат – 4.2% (95% CI: 0.1% – 21.1%, n=1).

Съпътстваща HCV инфекция е регистрирана при двама пациенти – един с наличие на положителни anti-HCV антитела, но отрицателен за HCV РНК и един – с HBV/HDV/HCV тройна инфекция, anti-HCV Ab позитивен, HCV РНК позитивен (233IU/mL) и съставлява 4.2% (95% CI: 0.1% – 21.1%, n=1) от всички включени на противовирусна терапия. Един пациент е с хепатоцелуларен карцином – 4.2% (95% CI: 0.1% – 21.1%, n=1).

Резултати

През проучвания период (2013 – 2018 г.) от регистрираните 65 anti-HDV позитивни пациенти, HDV RNA позитивни резултати установихме при 63 от тях – 96.9% (95% CI: 89.3% – 99.6%). Нашите резултати ни доближават до резултатите докладвани от EASL (2017), според които при 87% от anti-HDV положителните серумни проби се отчита и хепатит D вирусна нуклеинова киселина.

Оценката на пациентите според Child – Turcotte – Pugh (СТР оценка по Чайлд) критериите (А, В и С) се извършва въз основа на стойностите на показателите билирубин, албумин и протромбиново време. Отбелязват се проявите на асцит и енцефалопатия според степента на изявеност.

Изследваните основни лабораторни и биохимични показатели на проучените от нас пациенти са представени в Табл. 21 в средни стойности (±SD).

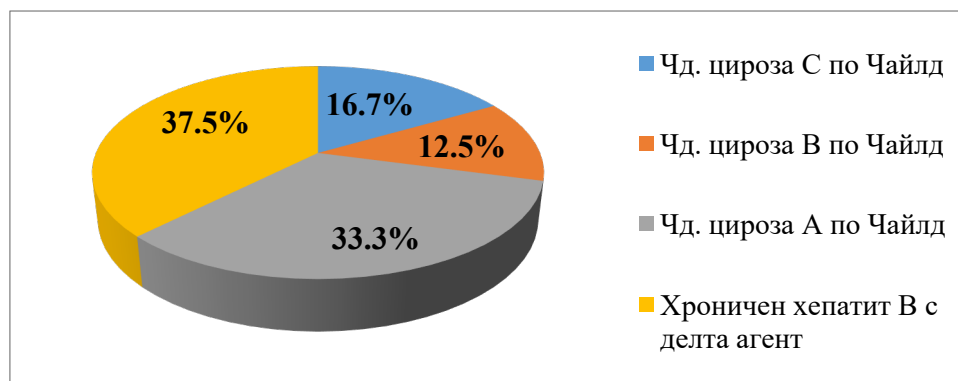
Таблица 21. Основни лабораторни показатели на пациентите включени на антивирусна терапия (n=24)

Година	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Общо
Hb(g/l) ± SD	128.3 (±2)	128.9 (±22.4)	135.2 (±17)	109 (±54)	10 (±52.2)	10 (±50.32)	129.8 (±25.4)
AST(U/L, UNL:41U/L ± SD	75.8 (±54)	76.8 (± 8.1)	90.7 (± 34.2)	89 (±56.3)	109.6 (±8)	86.7 (±42)	79.89 (±35.63)
ALT(U/L, UNL:41U/L ± SD	121.2 (±1)	90.8 (±52)	101.1 (±69)	119.2 (±89)	87.5 (±99.7)	123.1 (±98.41)	108.6 (±70.83)
γ – GT(U/L,UNL: 49U/L) ± SD	92 (± 9.8)	113.7 (±93.)	102.4 (±97.)	70 (± 42.3)	111 (±89)	111.4 (±122)	103 (±84.18)
AP(U/L, UNL: 129 U/L) ± SD range	133 (±103)	120.14 (±51.4)	145.4 (±0.4)	176.3 (±60)	175,4 (±56.72)	95.9 (±29.34)	125 (±52.59)

UNL* – горна граница на нормата

Показателят Hb (129.8 ± 25.4) е даден като средна стойност в g/dL. Биохимичните тестове включват серумни чернодробни аминотрансферази: AST, ALT, γ – GT и AP. Стойностите са измервани на изходно ниво преди началото на терапията, по време на терапията и в периода след лечението. Нивата на ALT са в границите на 28.66 U/L и 243.16 U/L, средно между 1.2 и 9.9 пъти над горната граница на нормата (UNL). Средната стойност на AST също е над нормата – 79.89 (± 84.18), с регистрирани минимална стойност 23.5 U/L и максимална – 147.0 U/L. При повечето циротични заболявания стойностите на ALT са по-високи от тези на AST, но в хода на болестта може да настъпи конверсия в съотношението, което е израз на прогресиращи патологични промени. Според критериите на СЗО, съотношение AST/ALT равно на 1 или над 1 е предиктор за развитие на чернодробна цироза (WHO, 2017). За целия период на изследване средните стойности на ензимите γ - GT и AP са съответно 103 (± 84.18) и 125 (± 52.59). За γ -GT отчетената минимална стойност е 14.5 U/L, а максималната – 315.5 U/L. AP е в границите на 47.0 U/L – 260.0 U/L.

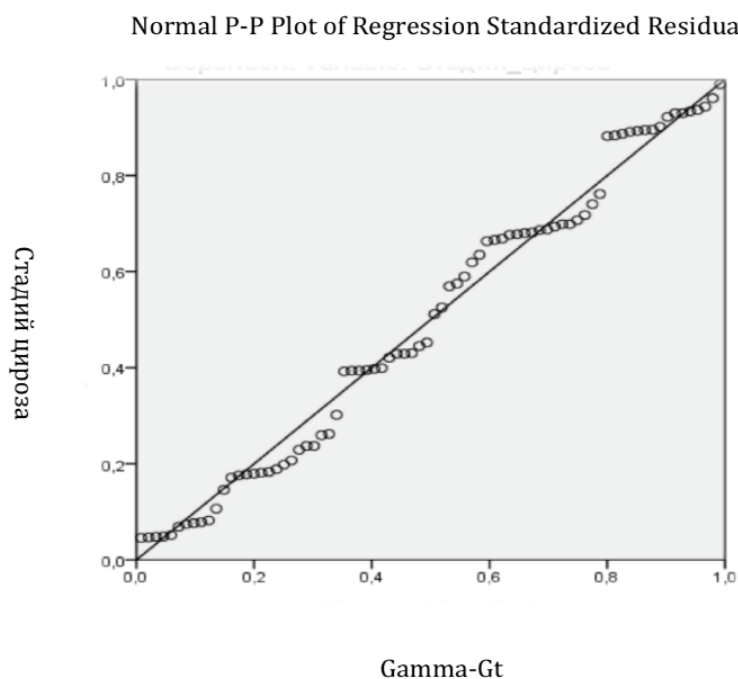
Разпределението на HBV/HDV положителните пациенти включени на противовирусна терапия, в това проучване на базата на лабораторно, хистологично и клинично поставена диагноза е представено на Фиг. 14. При 37.5% (95%CI: 18.8% – 59.4%, n=9) от пациентите е регистриран хроничен хепатит с преход в цироза. За останалите 62.5% пациенти (95% CI: 40.6% – 81.2%, n=15) диагнозата е чернодробна цироза. Според класификацията на СТР в стадий А на чернодробна цироза са 33.3% (95% CI: 15.6% – 55.3%, n=8), в стадий В – 12.5% (95% CI: 2.7% – 32.4%, n=3) и в стадий С – 16.7% (95% CI: 4.7% – 37.4%, n=4).



Фигура 14. Стадий и тежест на хроничното чернодробно заболяване при HBV/HDV инфекция

С цел да измерим математически връзката между стойностите на чернодробните ензими и стадия на чернодробна увреда е направен корелационен анализ на резултатите от всички средни стойности на отчетените серумни трансминази и връзката им с хистологичния стадий на чернодробното увреждане. Получените резултати не отчитат корелационна зависимост между ALT, AST и AP активностите с хистологичния стадий на чернодробното увреждане и наличието на цироза. Можем да заключим, че стойностите на тези ензими не отразяват точно хистологичните промени и не корелират със степента на чернодробно увреждане, което става ясно от коефициента на рангова корелация на Спийърман ($r_s=0.33$, p – value = 0.12; $p>0.05$).

Установихме чрез изчисление на коефициент на рангова корелация умерена връзка единствено между γ -GT ензима и стадия на цироза ($r=0.25$; $p=0.038$, $p<0,05$). Резултатът показва, че с повишаване на количеството на ензима, състоянието на пациента с влошава и хистологичните промени в черния дроб се задълбочават (от стадий А към стадий С по Чайлд). Тази линейна връзка показваме в линейното регресионно уравнение $Y= -0.348 (x)$, т.е. при всяко увеличаване на стойността на γ -GT ензима с 0.348 единици, състоянието на пациента, респективно и регистрираните промени са в негативен план. В нашето проучване, пациентът с клинична диагноза чернодробен карцином има и най-високите нива на γ -GT (315 U/L) - 6.4 пъти по-висока стойност от горна граница на нормата. Зависимостта между стойностите на gamma-GT и степента на чернодробното увреждане са представени на Фиг.15.



Фигура 15. Зависимост между стойностите на гатма – GT и степента на чернодробното увреждане

Изследване на HBV и HDV в Real-time PCR

Вирусологичните показатели HBV DNA и HDV RNA са оценявани на всеки 3 – 6 месеца по време на лечението, в края на лечението и 3 месеца след приключване курса на лечението. Според EASL (2017) вирусологичните отговори в резултат на провежданото антивирусно лечение варират в зависимост от продължителността и типа терапия.

HBV DNA

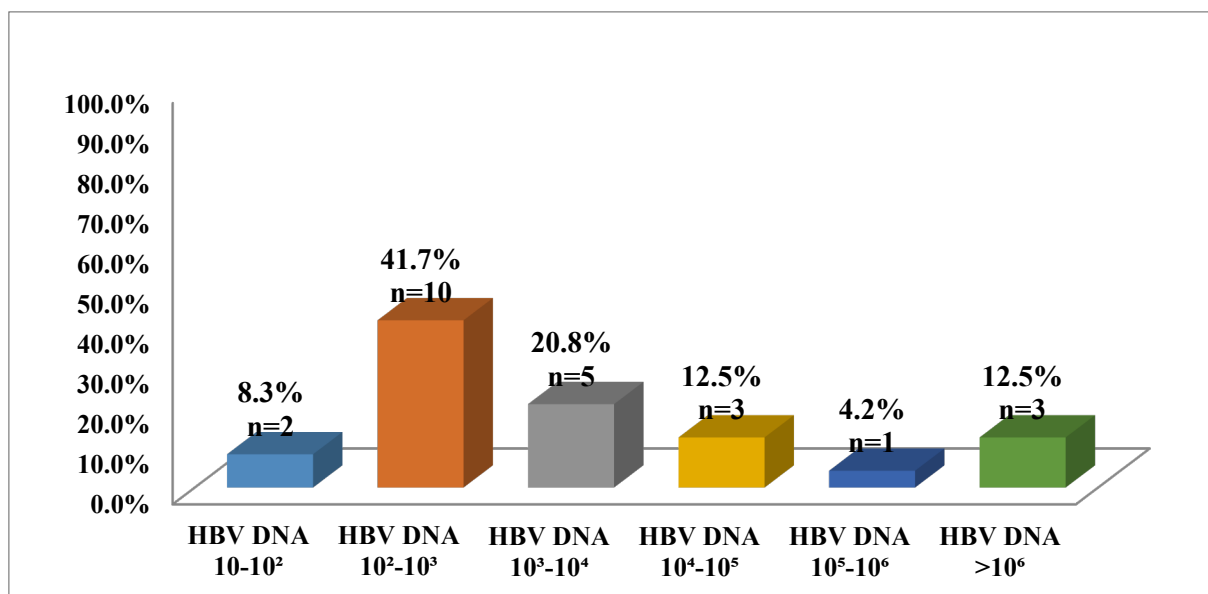
Количеството вирусен товар (HBV DNA) е измервано в copies/mL и IU/mL. При конвертиране, 1 IU/mL е равна на 4.5 ± 0.2 copies/mL според стандартите на теста. Резултатите в copies/mL се изписват в степен (напр. 10^5 copies/mL) Средните стойности на HBV DNA по години, в IU/mL и copies/mL са представени в Табл. 22.

Таблица 22. Средни стойности на HBV DNA за периода 2013 – 2018 г.

HBV DNA	2013	2014	2015	2016	2017	2018
IU/mL (средна стойност)	$1.7 \cdot 10^4$	$7.7 \cdot 10^3$	$9.2 \cdot 10^5$	$9.8 \cdot 10^4$	$1.5 \cdot 10^5$	$4.2 \cdot 10^2$
copies/mL (средна стойност)	$7.7 \cdot 10^4$	$3.4 \cdot 10^4$	$4.2 \cdot 10^6$	$4.4 \cdot 10^5$	$6.9 \cdot 10^6$	$1.9 \cdot 10^3$

Според отчетените нива на HBV DNA, разпределихме изследваните пациенти (n=24) в шест групи (Фиг. 16).

- Пациенти с HBV DNA от 0 до 100 copies/mL – 8.3% (95% CI: 1.0; 27.0, n= 2)
- Пациенти с HBV DNA от 10^2 до 10^3 copies/mL – 41.7% (95% CI: 22.1; 63.4, n=10)
- Пациенти с HBV DNA от 10^3 до 10^4 copies/mL – 20.8% (95% CI: 7.1; 42.2, n= 5)
- Пациенти с HBV DNA от 10^4 до 10^5 copies/mL – 12.5% (95 % CI: 2.7; 32.4, n=3)
- Пациенти с HBV DNA от 10^5 до 10^6 copies/mL – 4.2% (95% CI: 0.1; 2.1 n=1)
- Пациенти с HBV DNA $>10^6$ copies/mL – 12.5% (95% CI: 2.7; 32.4, n=3)



Фигура 16. Разпределение на пациентите по групи според HBV DNA (copies/mL)

Количествените нива на HBV ДНК не корелират със средните стойности на чернодробните ензими при пациентите ($r_s=0.34$; $p=0.17$). Не открихме също така корелация между наличието на цирроза, стадия на цирозата (по Чайлд) и нивото на HBV DNA виремия, т.е. пациентите с висок вирусен товар HBV DNA над 10^5 не са по-често с поставена диагноза цирроза и по-малка преживяемост от пациентите с по-нисък вирусен товар ($r_s=0.1$, $p=0.75$, $p>0.05$).

HDV RNA

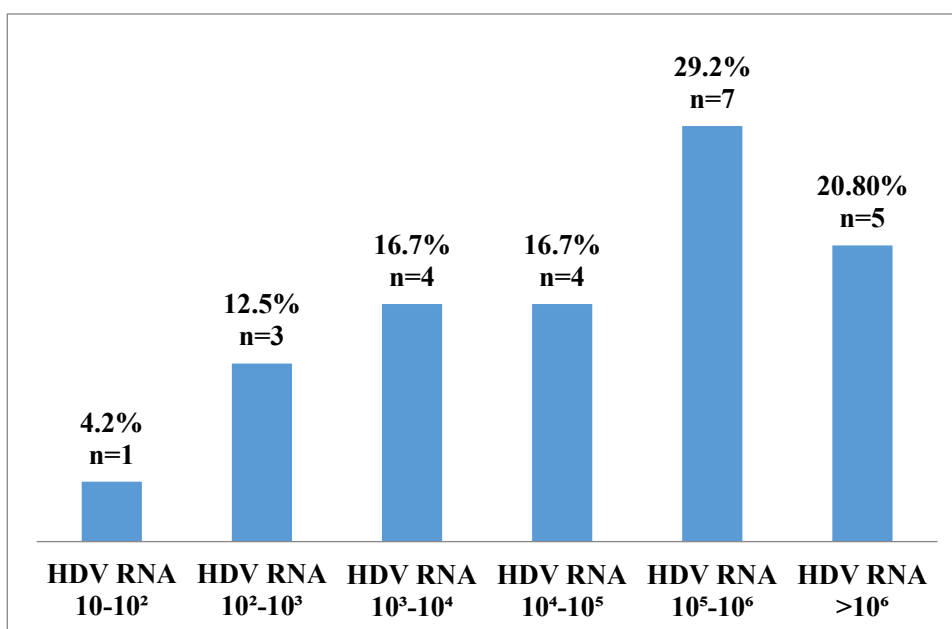
Регистрирахме стойности на HDV RNA виремията в диапазон 2.5×10^2 – 1.3×10^7 copies/mL. Средните стойности на HDV RNA по години, в copies/mL са представени в Табл. 23.

Таблица 23. Средни стойности на HDV RNA за периода 2013 – 2018 г.

HDV RNA	2013	2014	2015	2016	2017	2018
IU/mL (средна стойност)	$1.7 \cdot 10^4$	$7.7 \cdot 10^3$	$9.2 \cdot 10^5$	$9.8 \cdot 10^4$	$1.5 \cdot 10^5$	$4.2 \cdot 10^2$
copies/mL (средна стойност)	$7.7 \cdot 10^4$	$3.4 \cdot 10^4$	$4.2 \cdot 10^6$	$4.4 \cdot 10^5$	$6.9 \cdot 10^6$	$1.9 \cdot 10^3$

Според измерените нива на HDV RNA, аналогично разпределихме пациентите в шест групи (Фиг.17).

- Пациенти с HDV RNA от 0 до 100 copies/mL – 4.2% (95% CI: 0.1 – 2.1, n=1).
- Пациенти с HDV RNA от 10^2 до 10^3 copies/mL – 12.5% (95% CI: 2.7 – 32.4, n=3)
- Пациенти с HDV RNA от 10^3 до 10^4 copies/mL – 16.7% (95% CI: 4.7 – 37.4, n=4)
- Пациенти с HDV RNA от 10^4 до 10^5 copies/mL – 16.7% (95% CI: 4.7 – 37.4, n=4)
- Пациенти с HDV RNA от 10^5 до 10^6 copies/mL – 29.2% (95% CI: 12.6 – 51.1, n=7)
- Пациенти с HDV RNA $>10^6$ copies/mL – 20.8% (95% CI: 7.1 – 42.2, n=5)



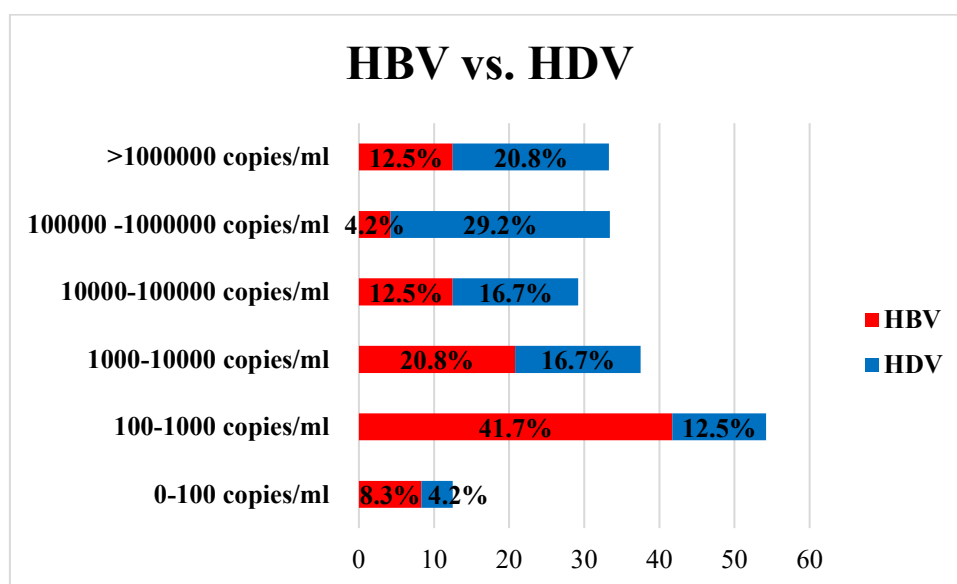
Фигура 17. Разпределение на пациентите по групи според количеството HDV RNA (copies/mL)

След направен корелационен анализ не открихме корелационна зависимост между нивата на HDV RNA и нивата на чернодробните ензими. Установихме, че коефициентът на корелация на Спирман между AST и HDV RNA е ($r_s = 0.33$, $p = 0.12$), между ALT и HDV RNA е ($r_s = 0.25$, $p = 0.25$), между AP и HDV RNA е ($r_s = 0.36$, $p = 0.09$). Корелационна зависимост открихме единствено между нивата на ензима γ -GT и HDV RNA ($r_s = 0.42$, $p = 0.05$), т.е. по-високия HDV RNA вирусен товар, води до регистриране на по-високи нива на ензима γ -GT. Не открихме корелация между наличието на цироза, стадия на заболяването и количеството HDV RNA ($r_s = 0.38$, $p = 0.54$, $p > 0.05$). В периода на проследяване установихме, че серумните нива на HBV DNA и HDV RNA се връщат до изходните стойности в рамките на 3 до 6 месеца след спиране на терапията и не се наблюдава повишаване на серумните аминотрансферази, които придружават това повишаване на вирусните нива.

Изследване на взаимодействието между HBV и HDV

От пациентите с приложена терапия мъжете са 58.3% (95%CI:36.6%-77.9%,n=14), а жените – 41.7% (95%CI:22.1%-63.4%,n=10). Възрастовият диапазон на пациентите е 28 – 68 г. (средна възраст 44.45±SD 12.17).

Нивата на HBV DNA и HDV RNA в серумите на изследваните пациенти са в относително широк диапазон. HBV DNA при различните пациенти е в границите на $1.9 \times 10^2 - 7.0 \times 10^6$ copies/mL. HDV RNA виремията е в границите на $2.5 \times 10^2 - 1.3 \times 10^7$ copies/mL. Според EASL за висок вирусен товар при HBV DNA се приемат нива над 10^5 copies/mL и тъй като за HDV RNA все още няма такъв стандарт, ние аналогично приемаме тази прагова стойност. В резултат на проведените Real-time PCR тестови процедури, изчислихме средните стойности на HBV DNA and HDV RNA вирусния товар, за целия период и класифицирахме три групи пациенти (Фиг. 18).



Фигура 18. Сравнителен анализ между HBV DNA и HDV RNA вирусни нива в copies/mL

- Пациенти с висок вирусен товар за HDV RNA ($>10^5$ copies/mL) и нисък за HBV DNA ($<10^5$ copies /mL) – 50.0 % (95% CI: 29.1 – 70.9, n=12);
- Пациенти с едновременно нисък HDV RNA и HBV DNA вирусен товар ($< 10^5$ copies/mL) – 33.3% (95% CI: 15.6 – 55.3, n=8);
- Пациенти с нисък HDV RNA ($<10^5$) и висок HBV DNA вирусен товар ($>10^5$) – 16.7% (95% CI: 4.7 – 37.4, n=4).

При проведен Spearman's rank correlation тест, поради ненормално разпределение на данните за двата вируса (и в двата случая Shapiro – Wilk normality test регистрира $p < 0.00001$), се получава средна по сила обратна корелация между нивата на двата вируса ($r_s = -0.34$, $p = 0.1$, $p > 0.05$). Въпреки липсата на статистическа достоверност не изключваме възможността да има обратна зависимост между вирусните товари на HBV и HDV, но такова проучване трябва да се проведе сред по-голяма извадка от пациенти.

Съществуват две форми на едновременна HBV и HDV инфекция. В изследваната от нас популация двама от пациентите (един мъж – 28 г. и една жена – 35 г.) са с анамнестични и лабораторни данни за HBV/HDV коинфекция и прекаран в миналото остър вирусен хепатит – 8.3% (95% CI: 1.0 – 27.0, n=2). При останалите пациенти – 91.7% (95% CI: 73.0 – 99.0, n=22) данните насочват към HDV суперинфекция на вече инфектирани с HBV лица.

Чернодробни биопсии са направени при 33.3% (95% CI: 15.6% – 55.3%, n = 8) от пациентите и резултатите са оценени чрез METAVIR система. Некроинфламаторната активност на изследваните лица е средна (METAVIR резултат, вариращ от 1 до 3, средно 2). Фиброзата е със средна оценка F3, варираща от F2 до F4). Чернодробната биопсия, която я задължителна при пациенти подлежащи на антивирусно лечение не се извършва при наличието на контраиндикации, технически неуспешен опит или при доказана хистологично в миналото чернодробна цироза.

В нашето проучване всички включени пациенти са били с прекратена поне преди една година терапия с други медикаменти с цел да се отчетат максимално коректни резултати.

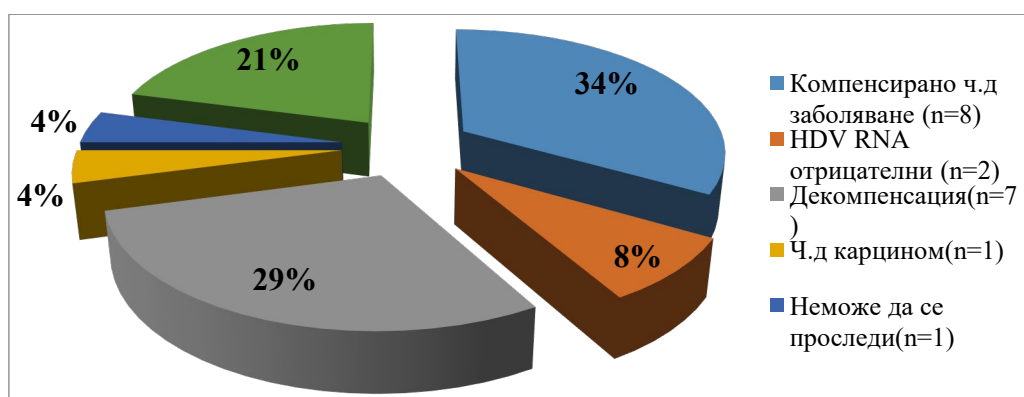
Лечението на пациентите с хронична HBV/HDV инфекция в нашето проучване включва лечение с интерферон (INF Interferon alpha 2a Roferon A) – стандартен и пегилиран (PEG-IFN, Pegasys), нуклеозиден аналог Lamivudine (Zeffix) и нуклеотидния аналог Tenofovir (Viread). Отговорът на лечението с интерферон и нуклеоз(т)идни аналози се оценява по биохимични, серологични, вирусологични и хистологични показатели (EASL, 2017). В нашето изследване 33.3% (95% CI: 15.6% – 55.3%, n=8) от пациентите преди включването им в проучването са лекувани със стандартен интерферон, в продължение на 6 до 12 месеца (средно време на лечение 9 месеца). Лечението с PEG-IFN може да осигури по-продължителна ремисия според литературата, но е ефективно в ограничена група пациенти, главно при ниско ниво на вiremия и високи стойности на серумните аминотрансферази (Krastev Z, 2006; Желев Д и съавт., 2008). В нашето проучване пациентите, лекувани с IFN alpha 2a (Roferon A) са 20.8% (95% CI: 7.1% – 42.2%, n=5), а с Pegasys – 41.7% (95% CI: 22.1% – 63.4%, n=10). Терапия с Lamivudine е приложена при 29.2% (95% CI: 12.6% – 51.1%, n=7) от пациентите, като при един са регистрирани мутации I204 и I80 на фона на леч с Zeffix – 14.3% (95% CI: 0.4% – 57.9%, n=1). Трима пациенти – 12.5% (95% CI: 2.7% – 32.4%, n=3) са лекувани с комбинация от Lamivudine и стандартен IFN. Тази комбинация се оказва неефективна, тъй като не довежда до траен вирусологичен отговор и спад в нивото на HBV DNA (< 2000 IU/mL) в края на терапевтичния курс и 6 месеца след спиране на лечението. Двама пациента – 8.3% (95% CI: 0.1% – 27.0%, n=2), са лекувани с Tenofovir. Част от пациентите са лекувани с повече от един медикамент – 41.7% (95% CI: 22.1% – 63.4%, n=10). Резултатите в средни стойности са проследени в Табл. 24.

Таблица 24. Средни стойности на HBV DNA и HDV RNA по време на лечението и след лечение

Лечение	Етап на отчитане преди лечение		Етап на завършване на лечение		Етап след лечение	
	HBV log ₁₀ copies/mL	HDVlog ₁₀ copies/mL	HBV log ₁₀ copies/mL	HDVlog ₁₀ copies/mL	HBV log ₁₀ copies/mL	HDVlog ₁₀ copies/mL
IFN alpha 2a (Roferon A) (n=5)	4.6.10²	5.3.10⁵	1.3.10²	2.5.10⁴	2.3.10²	4.3.10⁵
PEG-IFN (Pegasys) (n=10)	1.1.10³	2.2.10⁴	8.10²	6.1.10³	1.7.10⁵	2.2.10⁴
Lamivudine (Zeffix) (n=7)	3.5.10³	3.6.10⁵	7.3.10²	3.1.10⁵	1.3.10²	3.7.10⁴
Tenofovir (Viread) (n=2)	3.4.10⁶	5.6.10²	4.2.10⁵	(-)	2.4.10⁵	1.8.10²

n – № на пациентите; HBV ДНК и HDV РНК copies/mL са дадени като средни стойности

В сравнителен аспект относителните дялове на ефекта от лечението и актуалното състояние на пациентите към края на изследването е представено на Фиг. 19. Негативизиране на HDV RNA установихме в 8.3% (95% CI: 0.1% – 27.0%, n=2) от случаите, лекувани с Tenofovir. Компенсирано чернодробно заболяване е установено в 33.3% (95% CI: 15.6% – 55.3%, n=8) от случаите, лекувани с Rofferon и Zeffix. Декомпенсация на хроничното заболяване е регистрирана в почти същия относителен дял – 29.2% (95% CI: 15.6% – 55.3%, n=7) пациенти, лекувани с Rofferon и Lamivudin. Един пациент е с чернодробен карцином – 4.2% (95% CI: 0.1% – 21.1%, n=1). За един пациент нямаме информация – 4.2% (95% CI: 0.1% – 21.1%, n=1). Летален изход е регистриран при пет от пациентите – 20.8% (95% CI: 7.1% – 42.2%, n=5), лекувани с Zeffix. Двама от починалите пациенти са мъже на средна възраст 36.5 г. – 40.0% (95% CI: 5.3% – 85.3%, n=2). Три от починалите пациенти са жени на средна възраст 51.3 г. – 60.0% (95% CI: 14.7% – 94.7%, n=3). Трима от починалите са в стадий С по Чайлд – 60.0% (95% CI: 14.7% – 94.7%, n=3), един – в стадий В – 20.0% (95% CI: 0.5% – 71.6%, n=1) и един – с диагноза хроничен В и D хепатит с преход към цироза – 20.0% (95% CI: 0.5% – 71.6%, n=1), констатирани в хода на лечението.



Фигура 19. Разпределение на пациентите според резултата от противовирусна терапия (2018 г.)

Разпределението на пациентите с приложено противовирусно лечение по повод хроничен хепатит В и D в зависимост от възрастта, проследени с определяне на HBV DNA и HDV RNA е представено в Табл. 25. Най-много са включените пациенти във възрастта 35 – 44 г., а най-малко – 65 – 74 г.

Таблица 25. Разпределение на изследваните пациенти в зависимост от възрастта

Възрастова Група (години)	Общо изследвани за HBV DNA и HDV RNA	Относителен дял %, (95%CI)
24 – 34 г.	5	20.8% (7.1% – 42.2%)
35 – 44 г.	8	33.3% (15.6% – 55.3%)
45 – 54 г.	4	16.7% (4.7% – 37.4%)
55 – 64 г.	6	25.0% (9.8% – 46.7%)
65 – 74 г.	1	4.1% (0.1% – 21.1%)
Общо	24	100.0%

При разпределение на пациентите във възрастови интервали от 10 години установихме, че най-много са пациентите лекувани с Roferon A във възрастта 24 – 34 г. – 60% (95% CI: 14.7% – 94.0%, n=3) и PEG-IFN във възрастта 35 – 44 г. – 62.5% (95% CI: 24.5% – 91.5%, n=5). Най-голям е относителният дял на лекуваните с Lamivudine във възрастта 45 – 55 г. – 75.0% (95% CI: 19.4% – 99.4%, n=3). Лекуваните с Tenofovir във възрастта 65– 68 г. са 100% (95% CI: 25.0% – 100.0%, n=1). По литературни данни при лица с установени HBV и HDV вирусни товари в

по-млада възраст се започва лечение с IFN, където се очакват най-голям процент респондери на лечението. В средна възраст и при незадоволителни резултати от лечението с IFN и PEG-IFN се предпочита Lamivudine (Zeffix). При вирусологичен пробив или установена резистентност към Lamivudine се използва Tenofovir (EASL, 2017).

Възrastова и полово свързана характеристика на изследваните пациенти

Разпределението на проследените в PCR пациенти разпределени в зависимост от пола и възрастта е представено в Табл. 26.

Таблица 26. Възrastова и полово свързана характеристика на изследваните пациенти

Възrastова група (години)	Пол		Общ брой (n)	Относителен дял %, (95%CI)
	Мъж	Жена		
24 г. – 34 г.	3	2	5	20.8% (7.1% – 42.2%)
35 г. – 44 г.	5	3	8	33.3% (15.6% – 55.3%)
45 г. – 54 г.	1	3	4	16.7% (4.7% – 37.4%)
55 г. – 64 г.	4	2	6	25.0% (9.8% – 46.7%)
65 г. – 74г.	1	0	1	4.1% (0.1% – 21.1%)
Общо	14	10	24	100%

Най-висок е дялът на изследваните пациенти във възрастов диапазон 35 – 44 г. – 33.3% (95% CI: 15.6% – 55.3%, n=8), съответно 35.7% от всички мъже (95% CI: 12.8% – 64.9%, n=5), както и 30.0% (95% CI: 6.7% – 65.2%, n=3) от жените. Възrastовата група, в която попадат най-малко лица, е 65 – 74 г. – само един мъж – 4.1% (95% CI: 0.1% – 21.1%, n= 1). С помощта на Хи-квадрат тест установихме, че въпреки разликата в относителните дялове по възрастни интервали, статистически значима обвързаност с пола не се открива ($X^2=8.6$; $p=0.63 >0.5$).

Обсъждане

В нашето проучване един пациент е с чернодробен карцином (4.2%). Разпространението на anti-HDV антитела според две проучвания в Турция е в рамките на 18.8% – 23.0% от HBsAg позитивните пациенти с НСС (Uzunlimoğlu O et al.2001; Deterkin H, et al., 2008). В едно проучване в Румъния при проследяване на 166 пациенти с компенсирана HDV-свързана цироза е установено, че 12% от тях са развили НСС (Gheorghe L et al., 2005). Някои автори обаче твърдят, че въпреки противоречията в епидемиологичните проучвания, HDV инфекцията не увеличава риска от хепатоцелуларен карцином (НСС) в сравнение с HBV моноинфекция (Abbas Z et al., 2015).

Според други автори, продължителната HDV репликация и чернодробното възпаление водят до цироза и образуване на НСС (Romeo R et al, 2009). Оксидативният стрес в резултат на тежката некроинфламаторна реакция може да прогресира до НСС. Смята се, че това става по пътя на дисрегулация на нуклеарния фактор карра В (NF-кВ), която се свързва с процеси на възпаление и канцерогенеза (Surh S et al, 2001). L-HDVAg активира този фактор по пътя на оксидативния стрес. Също така се стимулира продукцията на TNF- α . Рискът от развитие на НСС при такива пациенти по литературни данни е 3 пъти по-висок, а смъртността – 2 пъти по-висока (Liao FT et al., 2009).

Един от нашите пациенти е HBeAg позитивен и средната стойност на HBV DNA е над условната граница от 10^5 copies/mL. Нашите данни потвърждават твърдението, че HBeAg активността корелира с високи стойности на HBV репликацията.

Един от пациентите в нашето проучване е с хронична HBV/HDV/HCV инфекция. Пациентът е в стадий С по Чайлд, с понижени нива на плазмения албумин и завишен INR. Въпреки проведения курс на лечение завърши с екзитус леталис. Нашите данни потвърждават установеното в други проучвания за по-тежко увреждане на черния дроб при двойна

(HBV/HVD) и тройна (HCV/HBV/HDV) инфекция в сравнение с HBV или HCV моноинфекция (Grant PR et al., 2000).

Изнесените от нас данни сочат, че биохимичните показатели (чернодробни ензими – ALT, AST, AP) не отразяват коректно стадия на чернодробното заболяване и не корелират с нивото на HBV и HDV вирусния товар. Те варират през цели период на лечението и след това. Нашите данни корелират с тези в литературата (Castelnaud C et al., 2006 ; Manesis E et al., 2007; Marugan R et al., 2009). По литературни данни γ -GT се повишава от 5 до 10 пъти над горната граница на нормата при вирусни хепатити и цироза (El – Serag HB, 2012). В нашето проучване, пациентът с клинична диагноза чернодробен карцином има и най-високите нива на γ -GT (315 U/L) – 6.4 пъти по-висока стойност от горна граница на нормата. Този факт подсказва и вероятното участие на ензима в чернодробната канцерогенеза (Paolicchi A et al., 2002).

По информацията, която открихме в литературните източници за прагова стойност на серумните нива на HBV DNA, условно се приема 2000 IU / mL (10000 copies/mL; 10^5 copies/mL) (EASL, 2017). Според литературата HDV трябва да се определя количествено, посредством определяне на вирусния товар в серума. Серологичният подход не е с необходимата чувствителност при оценка на ефективността от прилаганото лечение (Zachou K et al., 2006). Според едни автори има връзка между нивата на HDV RNA и активността на заболяването (Yamashiro T et al., 2002). Други втори не потвърждават такава корелация (Zachou K et al., 2010). Нашите данни също не показват корелация между наличието на цироза и стадия на заболяването и количеството HDV RNA вiremия ($r_s=0.38$, $p=0.54$, $p>0.05$).

Според изложените от нас данни, нивата на HDV RNA и HBV DNA показаха средна по сила обратна корелация, т.е. по-високите HDV нива се свързват обичайно с по-ниска HBV вiremия. HDV репликацията доминира в 12 (50.0%) от пациентите, придружена от ниска HBV вiremия. Пациентите с ниско ниво на HDV RNA и високо ниво на HBV DNA са само 4 (16.7%) от всички изследвани. Обратната корелация между HDV вiremията и HBV вiremията не се счита напълно изяснена (Jardi et al., 2001; Ghamari et al., 2013). Според литературата ко/суперинфекция с няколко хепатотропни вируса се асоциира с разнообразни схеми на реципрочна инхибиция на вирусната репликация, като 70% – 90% от HDV RNA позитивните и HBeAg негативни лица са с ниски серумни нива на HBV DNA (Wedemeyer H et al., 2010). Редица автори считат, че HDV потиска не само HBV вирусната репликация, но и HCV репликацията при тройно инфектирани пациенти (Wedemeyer H, 2007). Когато при вече заразен с HBV пациент се прибави HDV инфекция, в кръвта се установява ниско ниво или не се откриват HBV DNA и DNA полимераза.

По данни от проспективно проучване в испанска болница на 33 пациенти с хронична HDV инфекция (2006 – 2007 г.), вирусната репликация на HBV и HDV се оказали доста променливи величини. При 54.5% от случаите доминира HDV репликацията, при 30.3% доминира HBV репликацията и при 15.2% – HBV и HDV поддържат близки нива. Тези данни показват, че в повечето случаи HDV потиска репликацията на HBV, но с репликационни колебания, регистрирани и от двата вируса в различни периоди от време (Romeo R et al., 2014). Според друго проучване (Mederacke I et al., 2010) количественото определяне нивата на HBsAg корелира с нивото на HDV RNA. По-високи нива на HBsAg могат да индикират и по-сериозни хистологични промени в хепатоцитите (Shin HH et al., 2008). Други автори считат, че продължителната репликация на HBV дори и в минимална степен се свързва с по-тежко хепатоцелуларно увреждане и поддържа HDV репликацията (Schlomag A et al., 2010).

Молекулярно-биологичните механизми на установените по-високи HDV-вирусни нива в сравнение с тези на HBV, при повечето от инфектираните с двата вируса пациенти са широко изследвани в последните години. Установено е, че HDV протеините p24 и p27 потискат усилвателя (енхансера) на HBV репликацията, което води до нейното инхибиране. В литературата са изнесени данни, че HDV p27 трансактивира интерферон алфа-индуцируемия MxA ген, известен също като Mx1 ген, който също инхибира вирусната HBV репликация (Williams V et al., 2009; Romeo R et al., 2014). При проучване на пациенти с висока HDV вiremия и HBeAg позитивен серологичен профил е установена HBV DNA < 2000 IU/mL при

повечето от тях поне веднъж по време на проследяването. С HBV DNA < 2000 IU/mL са били 60% от тях (Heidrich B et al, 2012). Пациенти с мутации в нуклеотиди на позиция 1762, 1764 и 1896 в базалния *core* промотор /*pre-core* регион на HBV, също имат ниски HBV DNA нива (Pollicino T et al., 2011). В дисоциация с влошеното състояние на пациента, негативирането на лабораторните маркери за HBV инфекция и спада във вирусните количества е сигурен белег за смесена HBV/HDV инфекция (Marugan R et al., 2009).

От съществено значение при HDV позитивни пациенти е разграничаването на остра HDV/HBV инфекция (коинфекция) от HDV суперинфекция на инфектиран с HBV пациент, тъй като прогнозата и лечението са различни (Noureddin M et al., 2014). Според нашите резултати, по анамнестични и серологични данни 8.3% са лицата с хронифицирала HBV/HDV коинфекция (n=2) и 91.7% (n=22) – с HBV/HDV суперинфекция. При HDV/HBV коинфекция в по-голям процент от случаите се развива остър вирусен хепатит. HBV/HDV коинфекция се развива при едновременно заразяване с двата вируса (Smedile A et al., 1982). HBV/HDV суперинфекция се развива на фона на предшестваща хронична HBV инфекция. Редица проучвания сочат, че в сравнение с HBV моноинфекцията, при коинфекция заболяването хронифицира при около 10% от пациентите (WHO, 2017). Според други литературни данни хронифициране при коинфекция се наблюдава в по-малко от 5% (Farci P, 2012; Negro F, 2014). Тъй като при суперинфекция HDV намира благоприятна среда за размножаване, изходът най-често е развитие на хронична HDV инфекция.

Според други източници, HDV суперинфекция на хронично инфектиран с HBV индивид причинява обикновено по-тежък остър хепатит с кратък инкубационен период, и води до хронифициране в повече от 90% от случаите (Smedile A et al., 1994; Pascarella S et al., 2011). Изследвания проведени в Италия, Испания, Гърция и Германия потвърждават по-тежкото протичане на заболяването при HDV суперинфекция, в сравнение с HBV моноинфекция (Calle – Serrano B. et al., 2014). HDV суперинфекция може да доведе до развитие на цироза в рамките на 2 години при 10% – 15% от пациентите (Yurdaydin C, et al., 2010).

Според нашите резултати интерферонът (IFN) ефективно води до снижаване нивата на серумните трансминази (ALT), снижава нивата на HDV RNA, но не води до трайно негативиране на HDV RNA. Според някои автори лечението със стандартен IFN не винаги води до траен вирусологичен отговор, но води до спад в нивото на HDV репликацията. Това насърчава пациента да продължи с терапията (Manesis E et al., 2007). Приложението на IFN е с предварително определена продължителност и не води до селекция на вирусни мутанти (Castelnau C. Et al, 2006). Всеобщо становище в медицинската наука и практика е, че все още не е открита ефективна антивирусна терапия за лечение на хроничен хепатит D (Romeo R et al. 2015). Около 25 % от пациентите приемащи PEG-IFN α веднъж седмично са показали подълготрайно намаляване нивото на HDV RNA, но при една част от тях е регистриран вирусологичен пробив (Lamers MH et al., 2012; Heidrich B et al., 2014).

По наши данни, PEG-IFN се понася добре от пациентите и води до вирусологичен отговор, дори и в случай на предишен неуспех при приложение на стандартната IFN терапия. Според нашите данни при един пациент, лекуван в два курса стандартен IFN и 2 курса PEG-IFN, се получи отличен терапевтичен ефект с негативиране на HBV DNA и HDV RNA и нормализиране на аминотрансферазите. Вирусологичен и биохимичен пробив е отбелязан една година след края на терапията. Другият успешно лекуван пациент е с продължителен вирусологичен отговор (неоткриваеми нива на HDV RNA шест месеца след лечението). Резултатите от нашия анализ са потвърждение на резултати от други изследвания, а именно че лечението с PEG-IFN води до траен вирусологичен отговор до шест месеца след лечението при една четвърт от пациентите (Abbas Z et al., 2012). При пациентите с хроничен делта хепатит на монотерапия с Lamivudine не беше отбелязан положителен резултат и трайно намаляване нивата на HDV RNA.

Нашите резултати категорично показват, че Lamivudine води до забележим спад в серумните нива на HBV DNA, но има слаб или никакъв ефект върху нивата на HDV RNA. В комбинация с INF, Lamivudine не задържа нивата на HBV DNA под 2000 IU/mL 12 месеца след

края на терапията. Друг недостатък на Lamivudine е високата честота на резистентност. При един от нашите пациенти (14.3%) се установи мутация I204, I80 на фона на лечение с Lamivudine. По литературни данни резистентност се среща при около 15% – 60% от пациентите (Griffiths PD, 2009; Zoulim, 2009; Zoulim F, 2005). Резистентните HBV показват мутация в кодон 552 (tyrosine-methionine-aspartate-aspartate (YMDD) на HBV RNA зависимата DNA полимераза (Doo E et al, 2001). Появяват се 6 – 8 месеца след началото на терапията. Мутации в С домена детерминират резистентност към Famciclovir.

Използването на високи дози от медикаментите не предотвратява мутационните процеси (Daryl T et al., 1999). При наличие на вирусологичен пробив на фона на терапия с Lamivudine според изследователите, трябва да се включва Tenofovir, като средство на избор (WHO, 2017). Тенофовир дизопроксил фумарат (Viread) е много ефективен и потиска HDV репликацията (Romeo R et al., 2014). В настоящото изследване всички пациенти на лечение с Tenofovir (n=2) са отговорили с неоткриваема HDV RNA в края на терапията.

4.3. Определяне на относителния дял на окултно HBV носителство в Североизточна България

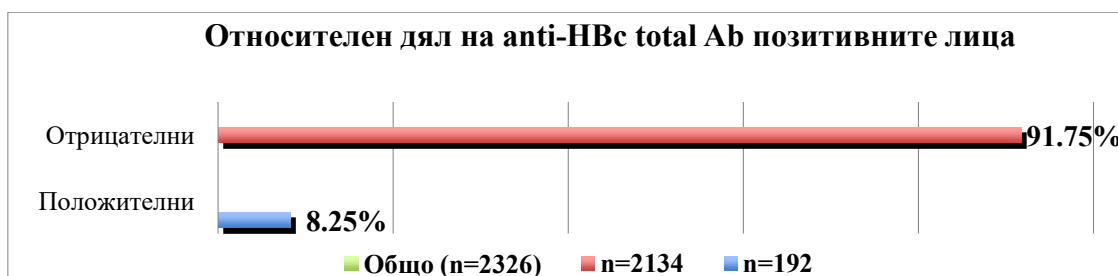
4.3.1. Дефиниране на разпространението на HBsAg негативните, anti-HBc total Ab положителни лица в случайно подбрана популация с приложение на ELISA и CLIA

Описание на извадката

Настоящото ретроспективно проучване обхваща 2326 серумни проби на лица в случайно подбрана популация във възрастовия диапазон 2 – 90 г. Серумните проби са изследвани във вирусологична лаборатория на УМБАЛ „Св.Марина“, в периода 2010 – 2014 г. Средната възраст на таргетната група е 49.92 години (SD±19.32). Делът на изследваните мъже е 60.7% (95% CI: 58.6 – 62.7, n=1411). Жените съставляват 39.3% (95% CI: 37.3 – 41.3, n= 914).

Резултати

Резултатите от нашето проучване показват, че в обща популация разпространението на anti-HBc total Ab позитивните лица е в 8.25% (95 % CI:7.2 – 9.4, n=192) на фона на средна за България HBV ендемичност. За част от тези лица не се изключва носителство на anti-HBs Ab (Фиг. 20).



Фигура 20. Разпространение на изолирани anti-HBc total Ab положителни HBsAg отрицателни лица в обща популация

Възrastова характеристика на разпространението на маркер anti-HBc total Ab

За по-точно дефиниране разпространението на anti-HBc Ab разделихме пациентите в 10 възрастови групи и равни 10-годишни интервали. Процентно най-голяма честота положителни резултати наблюдавахме във възрастов диапазон 33 – 42 г. – 14.2% (95 % CI:10.5 – 18.8, n=42) и 43 – 52 г. – 13.3% (95 % CI:9.8 – 17.5, n=43) от изследваните в съответния възрастов интервал (Фиг. 21). Носителство на anti-HBc total Ab установихме при малък брой деца и възрастни над 82 г. Във възрастовия диапазон 2 – 12 г. разпространението е в 2.7% (95

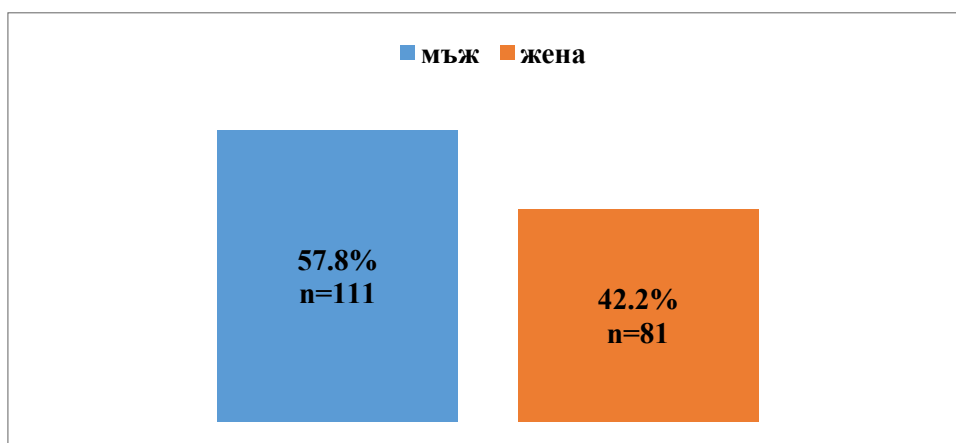
% CI:0.3 – 9.4, n=2). Децата са заразени най-вероятно перинатално (вертикална трансмисия) от HBsAg позитивни майки. Само един пациент – 3.3% (95 % CI: 0.1 – 17.2, n=1), на възраст над 82 г., показва положителен резултат, вероятно поради настъпващата чернодробна дисфункция с напредване на възрастта и по-високия леталитет при хроничен и окултен хепатит В.



Фигура 21. Разпределение на anti-HBc total Ab положителните лица в зависимост от възрастта в обща популация

Полово свързана характеристика в разпространението на anti-HBc total Ab в обща популация

При направеното от нас разпределение на положителните лица в обща популация в зависимост от пола установихме по-висок относителен дял на мъжете – 57.8% (95 % CI: 50.5 – 64.9, n=111) в сравнение с този на жените – 42.2% (95 % CI: 35.1 – 49.5, n=81) (Фиг. 22).



Фигура 22. Относителен дял на положителните лица в теста за определяне anti-HBc total Ab в зависимост от пола

Резултатите от Хи-квадрат анализа показаха, че anti-HBc total позитивността няма обвързаност с пола. При сравняване на резултатите на изследваните мъже и жени на базата на anti- HBc total позитивността не открихме статистически значима разлика ($\chi^2= 0.725$; $p=0.394$), въпреки по-високия процент на положителните мъже.

Обсъждане

Съществуването на окултна HBV инфекция (Occult hepatitis B Infection – OBI) става ясно през 80 – те години на миналия век. Оказва се, че OBI може да бъде с продължителни последици за инфектираните пациенти (Giudice CL et al., 2008; Nishikawa H et al., 2013). Това е комплексно заболяване, което може да окаже негативно влияние в различни клинични аспекти. Лицата с OBI могат включително да предават инфекцията при кръвопреливане или органна трансплантация. При състояния на имunosупресия по повод друго основно заболяване, инфекцията може да претърпи реактивация (Minuk GY et al., 2005; Mitri MS et al., 2010).

Според консенсус от срещата в Таормина (2008) и подкрепен от EASL, където са обсъждани биологията и клиничните последици от така наречената „окултна“ фаза на хроничната HBV инфекция, на базата на HBV Ab профила, OBI се разделя на две серологични форми. По-често (около 80%) се установява anti-HBc total положителен серологичен маркер, в присъствие или отсъствие на anti-HBs Ab, и отсъствие на HBsAg (т.нар серопозитивен OBI). При около 20% от случаите, пациентите са HBV серонегативни (anti-HBc total и anti-HBs отрицателни) (Allain JP et al., 2012). За положителен anti-HBs резултат се приема този над 10 mIU/mL, тестван в стандартна ELISA техника.

Определянето на anti-HBc total антителата е особено важна първа стъпка за дефиниране на OBI. Тъй като при тези лица е възможна интермитентна виремия, съчетанието с количествено определяне на HBV DNA е особено препоръчително според литературата (Raimondo G et al., 2008; Urbani S, 2010). В последните години все по-активно този серологичен маркер се търси за първоначално дефиниране на „окултна или скрита“ хепатит В вирусна инфекция (Allan JP et al. 2004; Said Z, 2011). Антителата срещу HBV core антигена (anti-HBc Ab) се оказват най-важния серологичен маркер при HBV инфекция. Откриват се при остра и хронична инфекция и обикновено персистират до края на живота на преболедували и заразени лица. Според редица автори, причини за наличието на изолирани anti-HBc total антитела могат да бъдат няколко (Almeida NC et al., 2001). На първо място като причина се поставя статус след преболедувана HBV инфекция със загуба на откриваем HBsAg.

В някои случаи резултатът може да е фалшиво положителен, при кръстосано реагиращи антитела или изследването да е проведено в „прозоречен“ период при негативиране на HBsAg (Raimondo G et al., 2007; Nishikawa H et al., 2013). Окултната HBV инфекция реално съществува по целия свят и превалява различно в различните страни, и не на последно място относителният дял зависи и от различната чувствителност на тестовете и методите на изследване (Grob P et al., 2000). Проучвания в последните години доказват наличие на OBI при пациенти с изолирани anti-HBc Ab с честота, варираща в рамките на 0% – 15% (медиана 1.1%) (Hollinger FB et al., 2008; Huang XY et al., 2010). При доказване единствено на изолирани anti-HBc антитела, интерпретацията на резултата е трудна, защото не може да се дефинира конкретна диагноза (Sood K et al., 2016).

Според нашите резултати разпространението на anti-HBc total Ab позитивните лица в обща популация е 8.25% и по-високо от очакваното. При проучване сред донори на кръв в Германия честотата на изолираните anti-HBc Ab е 0.2 %, докато при интравенозните наркомани достига 47%. При друго проучване в Германия окултен HBV е установен в 1.6% от лицата с anti-HBc Ab положителни резултати (Jilg W et al., 1995). Според данни за Италия процентът на изолирани anti-HBc total положителни лица е 4.2%. При проучване в Иран са регистрирани по-високи стойности – 5.3%. Дефинираните данни в тези проучвания са за региони с ниска HBV ендемичност (Knöll A, 2006; Ramezani A et al., 2010).

Прави впечатление значителният дял на изолираните в нашето проучване anti-HBc положителни лица. Този факт отдаваме на по-високата честота на разпространение на маркерите на HBV в популацията в Североизточна България и големия брой изследвани лица. HBV е водеща причина за хронични чернодробни заболявания в Североизточна България с честота по литературни данни 26.57% – 30.4% (Иванова Л, 2011). При изследване на случайно подбрана популация (12 – 60 г.) в същия регион, носителство на HBsAg в съчетание с anti-HBc

total Ab е в 5.2% от изследваните лица (Русев В и съавт., 2003). В нашето ретроспективно проучване носителството на HBsAg в обща популация е 2.80%. Този спад и негативиране на HBsAg носителството в обща популация рефлектират в увеличаване относителния дял на изолираните anti-HBc total антитела, в някои случаи, вероятно в съчетание с anti-HBs Ab. По литературни данни за Пловдивски регион в България относителният дял на изолирани anti-HBc total е 2.08%, на фона на интермедиерна HBsAg ендемичност (3.96%) (Атанасова М, 2016).

Основно разпространението на позитивните anti-HBc total Ab в нашето проучване е сред лица в младежка и средна възраст (33 – 52 г.), както и в по-напреднала възраст (63 – 72 г.). Причина за получените резултати и флукуиращия ход на anti-HBc total Ab носителството може да се търси в натрупването на рискови фактори за предаване на HBV инфекцията и потвърждават хоризонталната трансмисия на вируса, като водеща при инфектирането в зоните със средна HBV ендемичност (рискови сексуални контакти, интравенозна употреба на наркотици, кръвни манипулации и др.). Jilg W et al., (1995) съобщават за пик в разпространението на anti-HBc total Ab при лицата във възрастов диапазон 61 – 70 г.

Подобно възрастово флукуиране на изолирани anti-HBc total Ab в обща популация с пик при лицата над 65-годишна възраст е открито от Fabris P et al., (2008) в проучване проведено в Северна Италия. Minuk и съавт. (2005), при проучване в Северна Америка, съобщават за пик на anti-HBc total Ab носителството във възрастта 41– 50 г., като различията не са статистически значими в сравнение с останалите възрастови групи $p=0.22$.

Установихме, че положителните anti-HBc total Ab резултати преобладават при мъжете в сравнение с тези при жените. Такива данни са открити и от други автори, като това може да се свърже с по-високата честота на експозиция на HBV при хетеросексуалните контакти (Chen CL et al., 2015). Според нашите данни, статистически значима разлика в разпространението на anti-HBc total Ab изолирани антитела между двата пола не беше установена. В литературата съществува противоречива информация. Някои автори съобщават за статистически значима разлика (Атанасова М, 2016) в превесът на мъжкия пол в сравнение с този при жените, като получените резултати са на границата на статистическата значимост ($p=0.041$). Други автори не намират статистически значими разлики (Minuk GY et al., 2005).

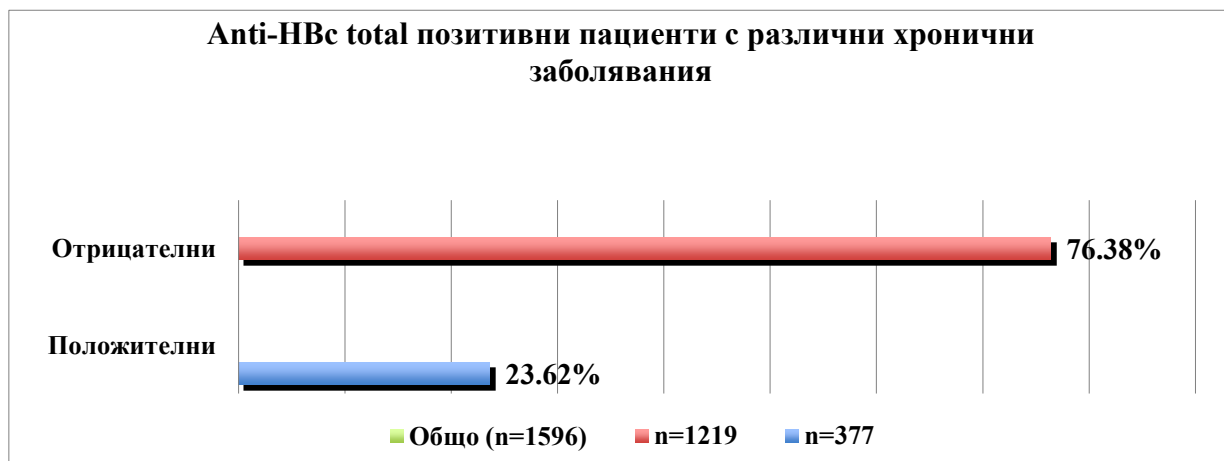
4.3.2. Изследване на пациенти с различни хронични заболявания и данни за чернодробна дисфункция за окултно носителство на HBV в ELISA

Описание на извадката

Настоящото ретроспективно проучване обхваща серумни проби на 1 596 пациенти с различни хронични заболявания и съпътстваща чернодробна дисфункция от клиниките по хепатогастроентерология и педиатрия, включително имunosупресирани пациенти от клиниките по хематология и вътрешни болести, насочени към Лаборатория по клинична вирусология УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна. Пациентите са във възрастов диапазон 4 – 91 г. и са изследвани в периода 2010 – 2014 г. Средната възраст на таргетната група е 49.41 г. ($SD\pm 19.08$). По отношение на пола разпределението е относително еднакво, с незначително преобладаване на мъжете – 52.4% (95 % CI:49.9 – 54.9, $n=836$). Жените съставляват 47.6% (95 % CI:45.1 – 50.1, $n=760$).

Резултати

В серологично изследваните от нас пациенти с различни хронични заболявания и съпътстваща чернодробна дисфункция, както и имunosупресирани пациенти, носителите на anti-HBc total Ab като единствен маркер за HBV инфекция са 23.62% (95% CI:21.6 – 25.8, $n=377$) (Фиг. 23).

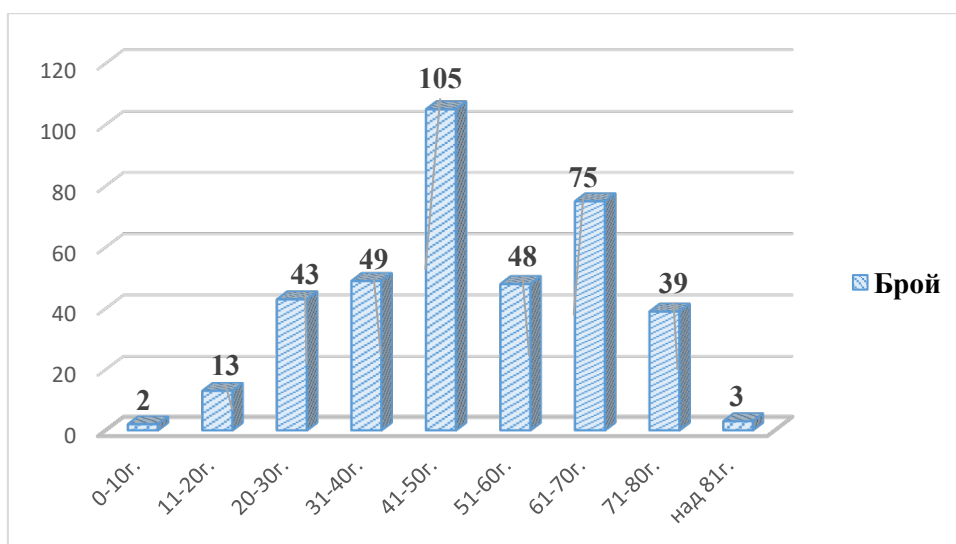


Фигура 23. Разпространение на изолирани anti-HBc total Ab позитивни HBsAg негативни пациенти с данни за чернодробна дисфункция

Получените положителни резултати (23.6%) при изследване на пациенти с различни хронични заболявания и чернодробна дисфункция са значимо по-високи от тези при лицата в обща популация (8.25%). Вероятна причина за това можем да търсим във факта, че хроничните заболявания и имunosупресията при тези пациенти активират латентните инфекции, маркер за което са съответно раздвижените серумни трансминази, което е и повода за търсене на скрито носителство на хепатит В. При клинично здрави лица, които не са изложени на множество реинфекции с HBV или имunosупресия, обикновено не се откриват клинични и лабораторни абнормности, което не дава повод за изследване и търсене на HBV инфекция.

Възrastова характеристика в разпространението на anti-HBc total Ab

Разпределихме пациентите в 9 възрастни групи и равни 10-годишни интервали. Процентно най-голяма честота положителни резултати получихме във възрастов диапазон 41 – 50 г. – 37.8% (95 % CI: 32.0 – 43.8, n=105), както и във възрастов диапазон 61 – 70 г. – 24.6% (95 % CI: 19.9 – 29.8, n=75) от изследваните в съответната възрастна група (Фиг. 24). Най-малко положителни лица с хронични заболявания и чернодробна дисфункция регистрирахме във възрастта до 10 години – 15.4% (95% CI: 1.9 – 45.4, n=2) и над 81 г. – 8.3% (95% CI: 1.8 – 22.5, n=3). Това възрастово разпределение наподобява разпределението, получено от нас при изследване в обща популация и потвърждава тренда за нарастване на относителния дял с възрастта. Данните, подобно на тези получени при изследване в общата популация, дефинират най-голям относителен дял на anti-HBc total Ab положителни лица в средна възраст (41 г. – 50 г.). След тази възраст, относителният дял на позитивните пациенти намалява макар и неравномерно, и е много нисък над 81-годишна възраст. По-високият относителен дял позитивни лица във възрастов диапазон 61 – 70 г. може да се дължи на имунна дисрегулация и активиране на скритата инфекция. Резултатите от Хи-квадрат анализа показаха статистически значима разлика ($\chi^2=26.78$; $p<0.001$) между лицата във възрастов група 41 – 50 г. и лицата в останалите възрастни диапазони.



Фигура 24. Разпределение на anti-HBc total положителните пациенти с чернодробна дисфункция в зависимост от възрастта

Полово свързана характеристика на разпространението на anti-HBc total Ab

Данни за доминиране на мъжкия пол над женския в разпространението на хепатит В вирусната инфекция се докладват в голяма част от литературните източници и концептуално, причината за това се приписва на половите хормони – андрогени и естрогени. Значение имат и половите контакти между живеещи в затворени общности, където се оформят ендемични огнища и част от заразените стават окултни HBV носители.

Разпределението на изследваните и относителните дялове на положителните пациенти в зависимост от пола, са представени в Табл. 27.

Таблица 27. Разпределение на изследваните пациенти в зависимост от пола

Пол		Разпространение на anti-HBc total		Общо
		Отрицателни	Положителни	
Мъже	брой	625	211	836
	%	74.8%	25.2%	100.0%
Жени	брой	594	166	760
	%	78.2%	21.8%	100.0%
Общо		брой	1219	1596
		%	76.4%	100.0%

Относителният дял на anti-HBc total Ab позитивните мъже е 25.2% (95 % CI: 22.3 – 28.3, n=211) от всички изследвани мъже. Anti-HBc total Ab позитивните жени съставляват 21.8% (95 % CI: 19.0 – 25.0, n=166) от всички изследвани жени. Въпреки разликите в относителните дялове при прилагане на Хи-квадрат анализ не получихме статистическо потвърждение за значимост на тази разлика ($\chi^2= 2.54$; p=0.11).

Нашите данни също показаха по-висок процент положителни мъже – 56.0% (95 % CI: 49.9 – 54.9, n=211) в сравнение с този на жените – 44% (95% CI: 39.0– 49.2, n=166), представено спрямо всички положителни лица (Фиг. 25).



Фигура 25. Разпределение на anti-HBc total положителни пациенти с хронични заболявания и чернодробна дисфункция в зависимост от пола

Обсъждане

В обсъждането на получените от нас резултати са изключени anti-HBs Ab позитивните пациенти. На серологичния профил, дефиниращ изолирани anti-HBc total антитела и неоткриваеми HBsAg и anti-HBs Ab, се отделя все повече внимание като предиктор за окултен хепатит В (Grob Pet al., 2000; Weber B et al., 2001). По литературни данни от изследвани пациенти с чернодробна цироза в Индия, която е зона с висока ендемичност според носителството на HBsAg, изолирани anti-HBc total антитела са доказани в 19.6% от случаите (Sood AK et al. 2016). Според нашето проучване, относителният дял е по-висок (23.62%), което може да се обясни с по-големия брой изследвани лица и тежката имуносупресия, на която са подложени част от тях. Не можем да изключим значението на чувствителността на използването серологични тестове.

Едни от най-информативните проучвания, разглеждащи връзката между наличие на anti-HBc total положителни резултати и ОВІ, са проведени сред пациенти, подготвяни за чернодробна трансплантация (Urbani S et al., 2010). Изследване на Dickson RC et al. (1997) на 647 американци, подлежащи на чернодробната трансплантация, на които не е провеждана превантивна антивирусна терапия, много ясно дефинира значението на този серологичен маркер при лица, подложени на имуносупресия. Серонегативните реципиенти, получили присадка от anti-HBc total позитивен донор, са развили в следствие хепатит В в 90% (18/20) от случаите. В същото време само 0.5% (3/651) от реципиентите с хепатит В, получили присадка от anti-HBc total отрицателен донор, развиват хепатит В посттрансплантационно.

Литературните данни, както и нашите резултати, показват значението на този маркер за дефиниране на вероятна ОВІ при рискови пациенти и при лица, подготвяни за трансплантация. Пациентите с ОВІ, подложени на имуносупресия, са с висок риск от реактивация на инфекцията в зависимост от продължителността и тежестта на имуносупресията. В тези случаи настъпва обратимост в инхибицията на генната експресия и се активира вирусната репликация. Може да се развие остра и дори фулминантна форма на хепатит В (Allain JP, 2004; Marzano A, 2007), както наблюдавахме при 0.5% (95 % CI: 0.2 – 1.9, n=2) от имуносупресирани пациенти от групата на anti-HBc total Ab позитивните. При наличие на клинично-лабораторни данни за чернодробна дисфункция в диференциално- диагностичен план според нас, трябва да се търси ОВІ, като първата стъпка е търсене на anti-HBc total Ab позитивност.

Данните по отношение на възрастта в нашето изследване дефинират най-голям относителен дял anti-HBc total Ab положителни пациенти във възрастови интервали 41 – 50 г.

и 61– 70 г. При анализ на възрастовото разпространение на положителните пациенти отново откриваме флукуиращ ход, подобно на резултатите, получени от нас в обща популация, поради различния брой изследвани лица в отделните възрастови групи. Тук също се запазва тенденцията на нарастване на относителния дял на разпространение с възрастта, с пик в средната възраст. След 71-годишна възраст anti-HBc total Ab носителството постепенно намалява. Това разпределение е отражение на предимно хоризонталния път на разпространение на HBV инфекцията. Тази закономерност се цитира и от други автори (Raimondo G et al., 2007; Samal J et al., 2012). Малкият брой положителни лица до 10 години в нашето проучване, вероятно заразени по вертикален път, или в много ранно детство, показва значението на скрининговото изследване на бременните жени за носителство на HBsAg и дефиниране на майките, които евентуално биха заразили новородените си деца.

Въпреки че нашите данни не показват статистическа значимост на различията между двата пола, в експериментални животински модели е доказана причината за по-голямата честота на положителните лица от мъжки пол (Chan HL et al., 2002). Черният дроб експресира нуклеарен андроген-рецептор (AR) и естрогенен рецептор α (ER α). Активираният андроген (AR) рецептори се свързват активно с „вирусен усилвател 1“ и стимулират вирусната транскрипция, докато естрогенподтиканите ER α рецептори пасивно потискат хепатоцитния нуклеарен усилвател 4 (HNF4 α), който не активира „усилвател“ 1. Това води до супресия на HBV репликацията при жените. Този молекулярен механизъм обяснява също по-високата честота на хепатоцелуларен карцином при мъжете. В сравнение с женския пол съотношението е 5 – 7:1 (Kondo R et al., 2014; Wang SH et al., 2015). Вероятно по тази причина след заразяване жените често остават скрити безсимптомни носители на HBV, а мъжете – по-често са хронични носители.

4.3.3. Молекулярно-биологично изследване на пациенти с чернодробна дисфункция за окултно носителство на HBV в PCR

За точно дефиниране на пациентите с ОБІ според утвърдените критерии от срещата в Таормина (2008), след първоначално тестване и определяне на серологичния статус (носителство на anti-HBc total и anti-HBs маркерите), е необходимо изследване за наличие на HBV DNA. Нашата цел бе да дефинираме суспектните за ОБІ по серологични маркери пациенти с различни хронични заболявания и съпътстваща чернодробна дисфункция с помощта на Real-time PCR.

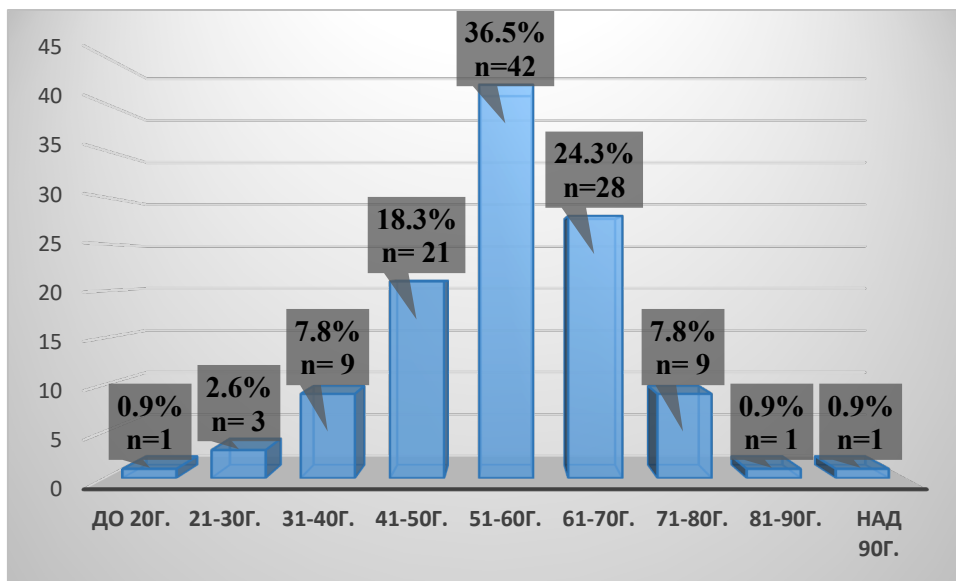
Описание на извадката

Изследвахме 115 от пациентите с различни хронични заболявания, повишени стойности на серумните трансаминази и съпътстваща чернодробна дисфункция. В проучването са включени лежачо болни пациенти в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна и амбулаторно изследвани пациенти. Относителният дял на хоспитализираните пациенти е 97.4% (95%CI: 92.6% – 99.5%, n=112). Относителният дял на амбулаторно изследваните пациенти е много по-нисък – 2.6% (95% CI: 0.5% – 7.4%, n=3). Превалират пациентите от Клиниката по хепатогастроентерология при УМБАЛ „Св. Марина“ – 69.6% (95% CI: 60.3% – 77.8%, n=80). Разпределението на изследваните пациенти по клиники е представено в Табл. 28.

Таблица 28. Разпределение на изследваните пациенти в УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна по клиники

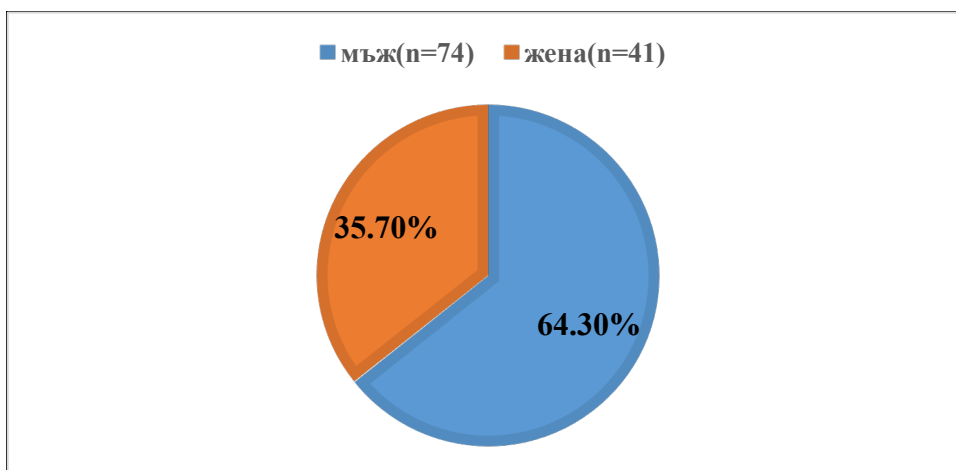
Клиника	Брой(n)	Относителен дял%
Хепатогастроентерология	80/115	69.6%
Вътрешни болести	18/115	15.7%
Инфекциозна клиника	3/115	2.6%
Амбулаторни пациенти	3/115	2.6%
Хематология	11/115	9.6%
Общо	n=115	100.0%

След определяне на серологичния HBV статус посредством стандартизирани търговски ELISA тестове, положителните anti-HBc total Ab, отрицателни в теста за определяне на HBsAg се изследваха в НРЛ по хепатитни вируси към НЦЗПБ – София за доказване на HBV DNA в Real-time PCR. Детекцията на HBV DNA в приложението молекулярно-биологичен метод е в граници $10^1 - 10^9$ IU/mL и чувствителността на теста – 10 IU/mL. Изследването се осъществи в периода 2015 – 2018 г. Пациентите бяха във възрастов диапазон 7 – 94 г. Разделихме всички изследвани в 9 възрастови интервала. Най-голям дял имат изследваните пациенти във възрастов диапазон 51 – 60 г. – 36.5% (95% CI: 27.7% – 46.0%, n=42) от всички изследвани (Фиг. 26). Най-малък относителен дял имат изследваните в крайните възрастови групи до 20 години и над 80 години, където регистрираме по едно лице от група – 0.9% (95% CI: 0.0% – 4.7%, n=1). Средната възраст на изследваните е 54.86 години (SD±12.97).



Фигура 26. Разпределение на изследваните пациенти в зависимост от възрастта

По-голям е дялът на мъжете – 64.3% (95 % CI: 54.9 – 73.1, n=74), а жените съставляват 35.7% (95 % CI: 26.9 – 45.1, n= 41) (Фиг. 27).

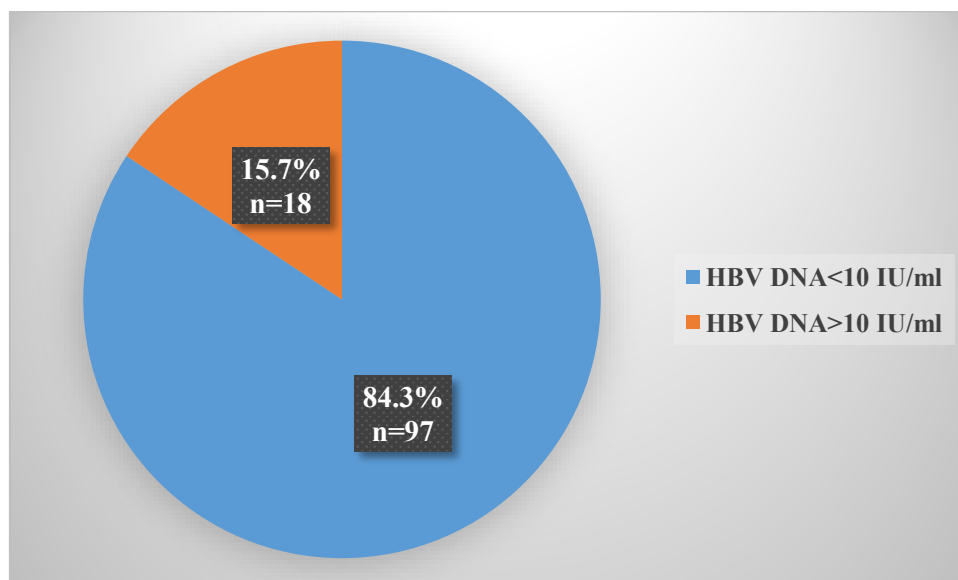


Фигура 27. Разпределение на изследваните пациенти в зависимост от пола(n=115)

Четирима пациенти – 3.5% (95% CI: 1.0 – 8.7, n= 4), имат серологични данни за HCV инфекция (anti-HCV Ab положителни). От тях двама пациенти са жени и двама – мъже (50/50%). Една от докладваните пациентки е на 63 години с клинични данни за чернодробна цироза – 25.0% (95 % CI: 0.6 – 80.6, n=1).

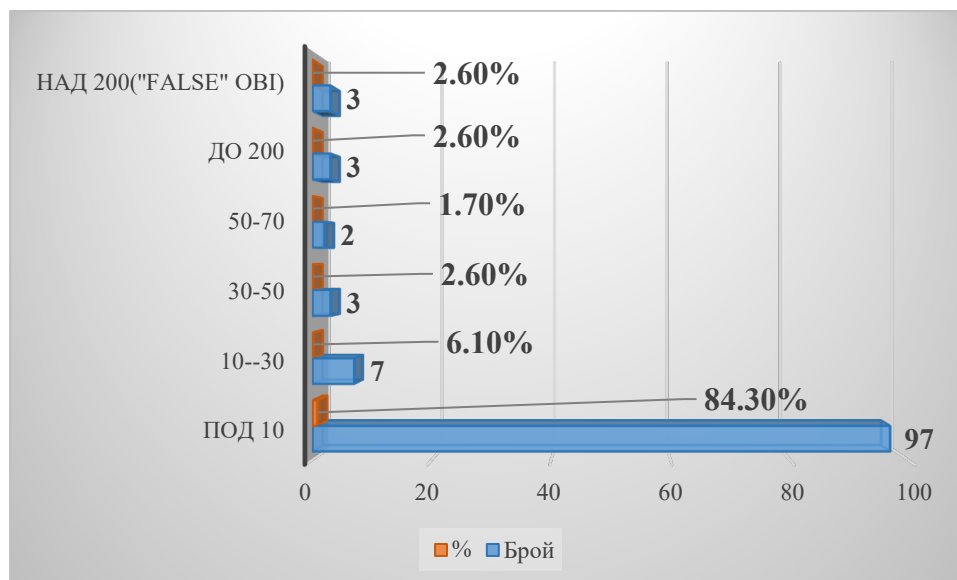
Резултати

Окултната HBV инфекция се характеризира с персистиране на HBV DNA в черния дроб, серума и лимфната система (периферни мононуклеарни клетки) на хора, при които изследването за HBsAg е с отрицателен резултат (Sorenson M, 2002). От всички изследвани пациенти (n=115), HBV DNA над 10 IU/mL открихме в 15.7% (95 % CI: 9.5 – 23.6, n=18), а 84.3% (95%CI:76.4 – 90.5, n=97) са с HBV DNA под 10 IU/mL (Фиг. 28).



Фигура 28. Разпределение на изследваната популация

Златен стандарт в диагностиката на ОБИ се счита молекулярно-биологичният тест в Real-time HBV PCR. В зависимост от получените резултати дефинирахме 6 групи пациенти (Фиг. 29).

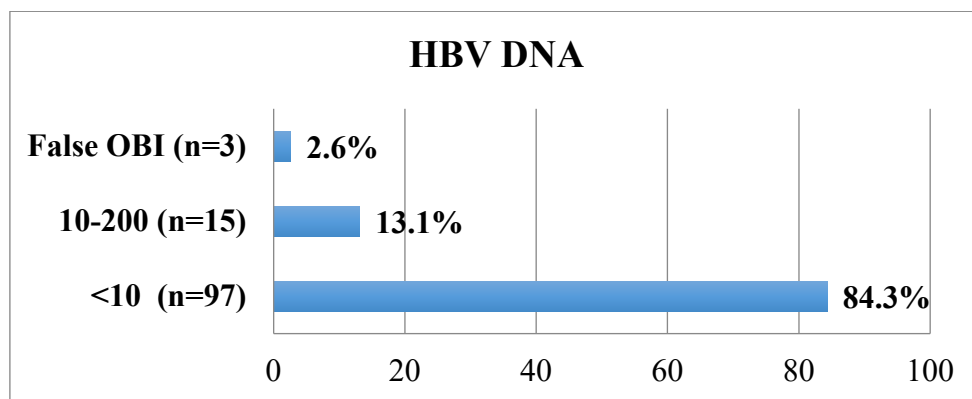


Фигура 29. HBV DNA в IU/mL

Най-много са лицата с вирусен товар 10 IU/mL – 30 IU/mL – 6.1% (95 % CI: 2.5 – 12.1, n=7). Нашите данни съвпадат с данните от литературата, според които вирусният товар при ОБИ е по-нисък от 10^5 IU/mL, обикновено между 10^1 – 10^3 IU/mL. В повече от 90% от случаите HBV е около 20 IU/mL, без значение възрастта (Mink GY et al., 2005; Yuen M et al., 2010). Пациентите с вирусен товар в рамките на 30IU/mL – 50IU/mL и тези до 200IU/mL са еднакви в

процентно отношение – 2.6% (95 % CI: 0.5 – 7.4, n=3). HBV DNA в рамките на 50 IU/mL – 70IU/mL се доказва при двама пациенти – 1.7% (95 % CI: 0.2 – 6.1, n=2). HBV DNA под откриваемото ниво на теста (10IU/mL) установихме в 84.3% (95% CI: 76.4 – 90.5, n=97).

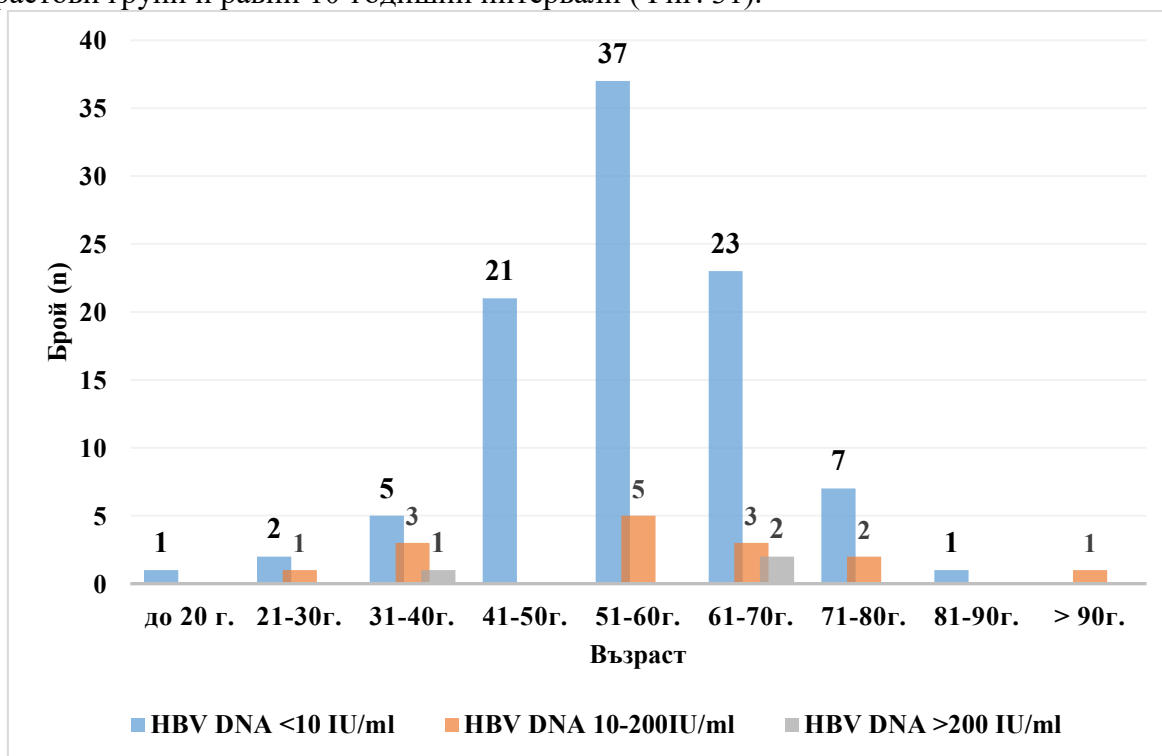
При 15 от изследваните от нас пациенти HBV DNA е под 200IU/mL, т.е. 13.1% (95 % CI: 7.5 – 20.6, n=15) и при трима е в нива над 200IU/mL– 2.6 % (95 % CI: 7.5 – 20.6, n=3). При вирусни нива над 200 IU/mL (Raimondo G et al., 2008) ОБИ се дефинира като „фалшиво“ окултен хепатит („false“ ОБИ) (Фиг. 30).



Фигура 30. Резултати от приложение на Real-time PCR за определяне HBV DNA при HBs total положителни пациенти за дефиниране на ОБИ (n=115)

Разпределение на HBV DNA положителните пациенти в зависимост от възрастта

С цел по-точно дефиниране влиянието на възраст, разделихме пациентите в 9 възрастови групи и равни 10-годишни интервали (Фиг. 31).



Фигура 31. Разпределение на изследваните пациенти в зависимост от количеството HBV DNA (IU/ml) и възрастта

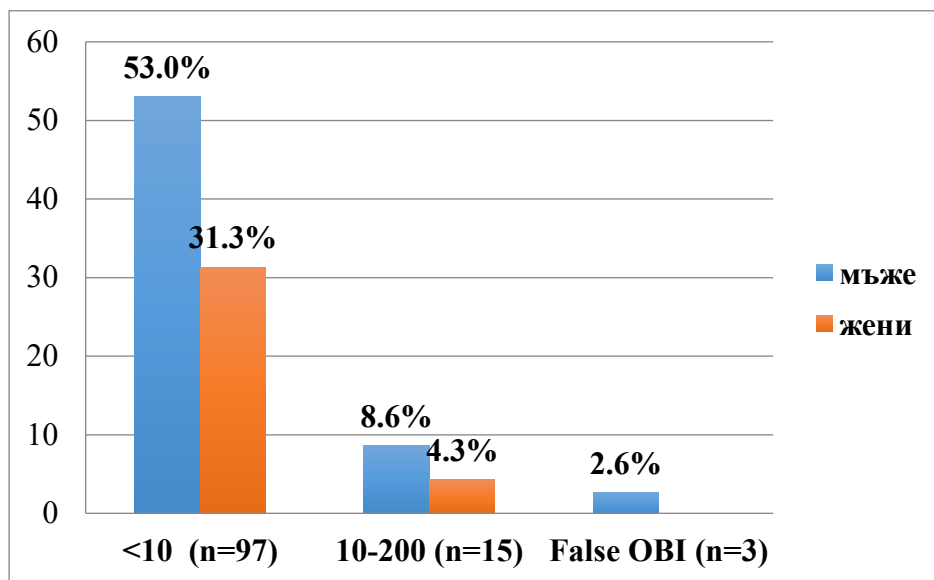
При анализ на нашите данни установихме по равен брой и най-малко положителни пациенти във възрастова група 21 – 30 г. – 0.9 % (95% CI: 0.0 – 4.7, n=1) и над 90 г. – 0.9% (95% CI: 0.0 – 4.7, n=1). Резултатите от Хи-квадрат анализа показаха, че процентно най-голяма честота на HBV DNA положителни пациенти се наблюдава във възрастова група 51 – 60 г. Тази разлика бе обвързана статистически с възрастта ($p < 0.0001$). Тестът на Крамер и Spearman корелационния анализ показват, че има значими асоциации с възрастта ($p < 0.05$), въпреки, че са слаби ($r = 0.662$, $p = 0.005$; Cramer V = 0.278, $p = 0.005$).

Полово свързана характеристика в разпространението на HBV DNA

Във всяка една от групите изследвани за наличие на HBV DNA доминира мъжкия пол. Това разпределение потвърждава изнесеното в литературата, че мъжете са по-засегнатия пол от хепатит В вирусната инфекция в сравнение с жените, което се потвърждава и в нейния окултен вариант (Wang SH et al., 2015). В нашето проучване броят на мъжете е двойно по-голям при тези с HBV DNA в диапазон 10 IU/mL – 200 IU/mL, и при пациентите с HBV DNA под 10 IU/mL. Мъжете с HBV DNA под 10 IU/mL са 53.0% (95% CI: 43.5 – 62.4, n=61), а жените – 31.3% (95% CI: 23.0 – 46.0, n=36). Пациентите мъже с окултен хепатит В са 8.7% (95% CI: 4.2 – 15.4, n=10) от изследваните, а жените – 4.3% (95% CI: 1.4 – 9.9, n=5). В групата пациенти, дефинирани от нас с “фалшиво“ окултен хепатит В, всички пациенти са мъже – 2.6% (95% CI: 0.5 – 7.4, n=3) (Фиг. 32).

Въпреки разликите в относителните дялове на положителните пациенти от двата пола, статистическа значимост не беше регистрирана ($X^2 = 0.57$; $p = 0.44$). В тест на Крамер също не се потвърди такава значимост (Cramer V = 0.201; $p = 0.541$)

Разпределението на изследваните пациенти по пол и възраст е представено в Табл. 29. Във възрастта до 20 г. и 81 – 90 г. всички изследвани са мъже. Прави впечатление абсолютно идентичното разпределение в зависимост от пола във възрастов диапазон 31 – 40 г. и 41 – 50 г., където изследваните мъже отново имат по-висок относителен дял. Женски пол превалява само при пациентите във възрастов диапазон 21 – 30 г. и в групата над 90 години, където единствената изследваната жена е с ОВІ.



Фигура 32. Разпределение на изследваните пациенти в зависимост от пола и количеството HBV DNA (n=115)

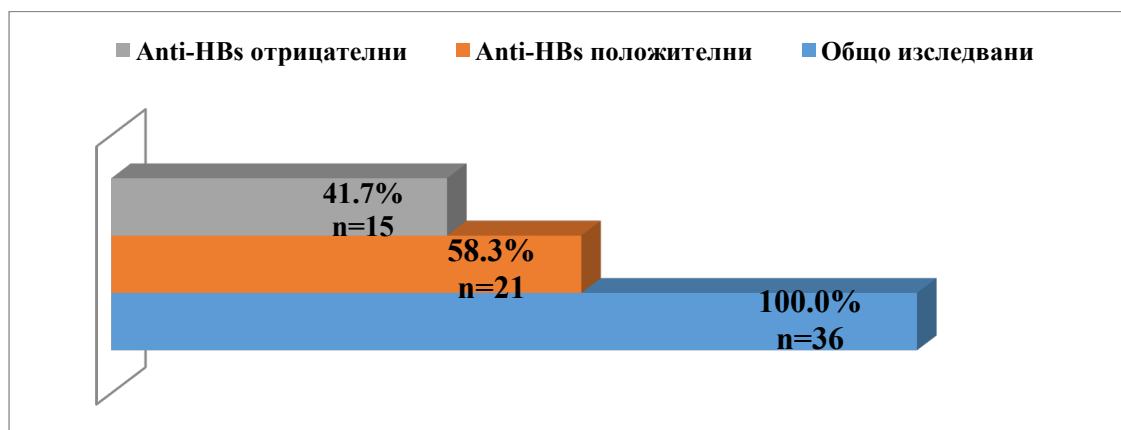
Таблица 29. Разпределение на изследваните пациенти в зависимост от пола и възрастта

			Пол		Общо
			мъж	жена	
Възраст (години)	до 20г.	брой	1	0	1
		%	100.0%	0.0%	100.0%
	21-30г.	брой	1	2	3
		%	33.3%	66.7%	100.0%
	31-40г.	брой	6	3	9
		%	66.7%	33.3%	100.0%
	41-50г.	брой	14	7	21
		%	66.7%	33.3%	100.0%
	51-60г.	брой	26	16	42
		%	61.9%	38.1%	100.0%
	61-70г.	брой	18	10	28
		%	64.3%	35.7%	100.0%
	71-80г.	брой	7	2	9
		%	77.8%	22.2%	100.0%
	81-90г.	брой	1	0	1
		%	100.0%	0.0%	100.0%
	над 90г.	брой	0	1	1
		%	0.0%	100.0%	100.0%
Общо		брой	74	41	115
		%	64.3%	35.7%	100.0%

При сравняване на резултатите по пол и възраст в Хи-квадрат анализ, статистически значима разлика между мъжете и жените във възрастта 51 – 60 г. и останалите възрастови интервали не беше доказана ($\chi^2= 0.17$; $p=0.67$).

Разпределение на пациентите с ОВИ в зависимост от носителството на anti-HBs Ab

За дефиниране относителния дял на серопозитивния ОВИ изследвахме 36/115 – 31.3% (95 % CI: 23.0 – 40.6, $n=36$) от пациентите с хронични заболявания и данни за чернодробна дисфункция за носителство на anti-HBs Ab. Anti-HBs положителен резултат ($> 10\text{mIU/mL}$) получихме при 58.3% (95 % CI: 40.8 – 74.5, $n= 21$). Anti-HBs Ab отрицателен резултат показаха 41.7% (95 % CI: 25.5 – 59.2, $n=15$) от изследваните (Фиг. 33).



Фигура 33. Относителен дял на пациентите (n=36) изследвани за anti-HBs Ab

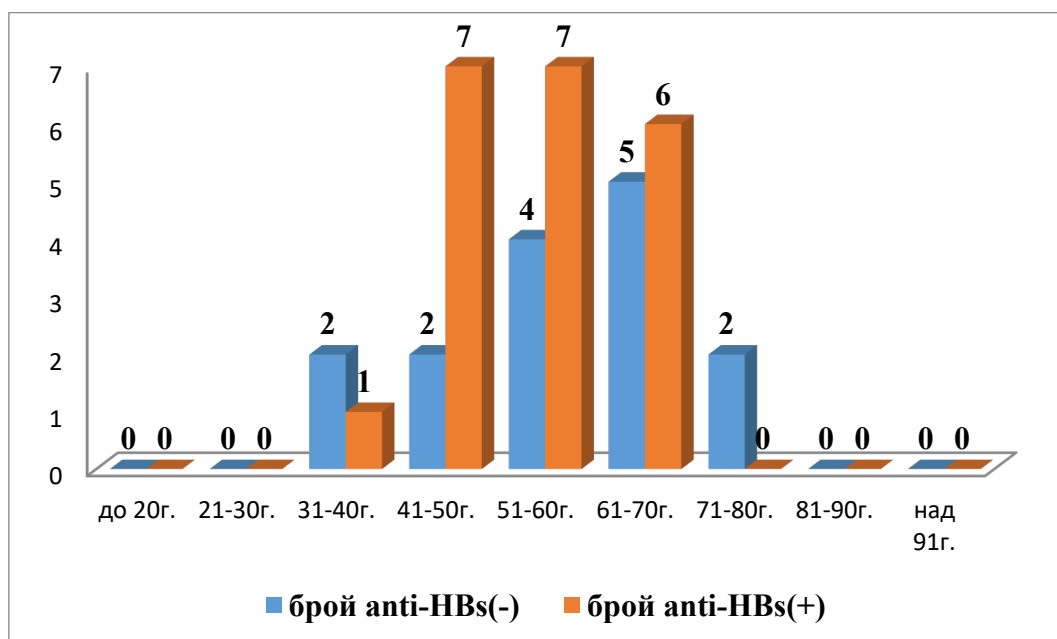
При разпределение на изследваната група пациенти в зависимост от пола установихме, че относителният дял на anti-HBs Ab положителните резултати при жените е 75.0% (95% CI: 42.8 – 94.5, n=12) и е по-голям в сравнение с относителния дял при положителните мъже – 50.0% (95 % CI: 29.1 – 70.9, n=9) (Табл. 30).

Таблица 30. Относителен дял на anti-HBs Ab по пол

Anti-HBs Ab		Пол		Общо	
		мъж	жена		
Отрицателни	брой	12	3	15	
	%	50.0%	25.0%	41.7%	
Положителни	брой	12	9	21	
	%	50.0%	75.0%	58.3%	
Общо		брой	24	12	36
		%	100.0%	100.0%	100.0%

При прилагане на Хи-квадрат анализа не се установи статистически значима разликата между признаците пол и anti-HBs Ab положителен резултат ($\chi^2= 2.12$; $p=0.35$). Прави впечатление, че броят на anti-HBs Ab положителните и отрицателните мъже е еднакъв (n=12). При жените (n=12), anti-HBs Ab положителни са 75.0% (95 % CI:42.8 – 94.5, n=9) от тях.

Възрастово свързаното разпространение на anti-HBsAb позитивните пациенти дефинирахме чрез разделяне в 9 възрастови групи и равни 10-годишни интервали. Резултатите не показаха статистически значими различия въпреки различията в процентно отношение. Най-много процентно представени положителни anti-HBs Ab резултати доказахме във възрастов диапазон 41 – 50 г. и 51 – 70 г. – 66.7% (95 % CI: 43.0 – 85.4, n=14), от всички положителни за този маркер. При прилагане на Хи-квадрат анализ не установихме статистически значими разлики при сравняване по пол и положителни anti-HBsAb резултати ($\chi^2=10.65$; $p=0.90$). Spearman корелационният анализ и теста на Крамер, също не показаха статистически значими разлики в различните възрастови групи ($r=0.05$, $p=0.743$; Cramer V = 0.270, $p=0.070$). Разпределението на anti-HBsAb положителните пациенти в зависимост от възрастта е представено на (Фиг. 34).



Фигура 34. Разпределение на anti-HBs изследваните пациенти в зависимост от възрастта

Сравнителен анализ на серумните нива на чернодробните ензими и данните в Real-time PCR

Според обобщените данни за AST, увеличението е между 1.3 и 329.1 пъти над горната граница на нормалните (41U/L). Средната стойност е 887.3(SD ±3148.4). ALT е с увеличени стойности между 1.02 и 394.4 пъти над горната граница на нормалните такива (41U/L). Средната стойност е 1027.0 (SD ±3783.9). Ензимът γ -GT е с увеличени стойности в рамките на 1.04 – 18.2 пъти над горната граница на нормалната стойност (49IU/L). Средната стойност е 190.7 (SD ±231.1). AP варира до 6.4 пъти над горна граница на нормалните стойности (129 IU/L). Средната стойност е 161.5 (SD ±168.1). Един от пациентите (мъж на 40 години), диагностициран с ОВІ и токсично увреждане на черен дроб показва стойности стотици пъти над горна граница на нормата (AST – 134 94 IU/L; ALT – 16 170 IU/L; GT – 124 IU/L; AP – 130 IU/L).

Сравнителен анализ на резултатите в зависимост от клиничната диагноза, стойностите на HBV DNA, възрастта и пола

Изследваните пациенти са с различни клинични диагнози (Табл. 31).

Таблица 31. Разпределение на пациентите в зависимост от клиничната диагноза (n=115)

Диагноза	Брой (n)	%
Чернодробна цирроза	48	41.7
Хроничен хепатит	19	16.5
Чернодробен карцином	6	5.2
Чернодробна стеатоза	19	16.5
Лимфоми	5	4.3
Токсично увреждане на черния дроб	1	0.9
Тромбоцитопения	1	0.9
Други*	16	13.9
Общо:	n=115	100.0

*Болест на Крон, Улцерозен колит, Холелитиаза

Това, което ги обединява, е суспектният за ОВІ серологичен профил и увеличените нива на серумните трансаминази. Най-голям относителен дял имат пациентите с чернодробна цирроза – 41.7% (95% CI: 32.6 – 51.3, n=48). Пациентите с клинична диагноза хроничен хепатит и чернодробна стеатоза съставляват съответно по 16.5% (95% CI:10.3 – 24.6, n=19). Пациентите с други заболявания, като болест на Крон, улцерозен колит, холелитиаза са 13.9% (95 % CI: 8.2 – 21.6, n=16). Останалите пациенти са с различни клинични диагнози – лимфоми (4.3%), чернодробен карцином (5.2%), тромбоцитопения (0.9%) и имат по-малки относителни дялове.

Разпределението на пациентите в зависимост от клиничната диагноза и вирусния товар в Real-time PCR е представено в Табл. 32.

Таблица 32. Сравнителен анализ на пациентите според клиничната диагноза и HBV DNA резултат

Диагноза		HBV DNA IU/mL						Общо
		<10	10-30	30-50	50-70	до 200	False OBI	
Чернодробна цироза	брой	37	4	3	1	1	2	48
	%	77.1%	20.8%	6.3%	2.1%	2.1%	4.2%	100.0%
Хроничен хепатит	брой	17	0	0	0	1	1	19
	%	89.5%	0.0%	0.0%	0.0%	5.3%	5.3%	100.0%
НСС	брой	5	0	0	1	0	0	6
	%	83.3%	0.0%	0.0%	16.7%	0.0%	0.0%	100.0%
Чернодробна стеатоза	брой	18	1	0	0	0	0	19
	%	94.7%	5.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
Лимфоми	брой	4	0	0	0	1	0	5
	%	80.0%	0.0%	0.0%	0.0%	20.0%	0.0%	100.0%
Токсично увреждане на черен дроб	брой	0	1	0	0	0	0	1
	%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
Тромбоцитопения	брой	0	1	0	0	0	0	1
	%	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
Други	брой	16	0	0	0	0	0	16
	%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%
Общо	брой	97	7	3	2	3	3	115
	%	84.3%	6.1%	2.6%	1.7%	2.6%	2.6%	100.0%

*Други – Болест на Крон, Улцерозен колит, Холелитиаза

Нашите данни показват, че най-висок относителен дял имат изследваните и HBV DNA положителни пациенти с диагноза чернодробна цироза. При сравняване на резултатите в зависимост от клиничната диагноза и вирусния товар в Хи-квадрат анализ, не установихме статистически значими различия ($\chi^2 = 3.29$, $p = 0.06$).

Данните за разпространението на OBI при пациентите с чернодробна цироза варират в различните региони. Според нашите данни, 22.9% (95% CI: 12.0 – 37.3, $n = 11$) от пациентите с OBI са с чернодробна цироза. Тези данни са близки до данни в две независими проучвания в Италия – 23.4% и 27%. (Saldanha J et al., 2001; Sagnelli E et al, 2008). Според изследвания във Франция, относителният дял на пациентите с OBI и клинична диагноза чернодробна цироза е 60% (Mrani S et al, 2007). Според проучване в Америка те са 19.4% (Hui CK et al., 2005), в Бразилия – 20% (Silva CD et al., 2004), в Китай – 32% (Chan HL et al, 2002). Според литературата относителният дял на пациентите с хроничен хепатит и OBI е 10.5% (95 % CI: 1.3 – 33.1, $n = 2$). Това се дължи отново на персистирането на вируса в чернодробните клетки и хроничното некроинфламаторно увреждане (Raimondo G et al., 2010).

В нашето проучване относителният дял на OBI при пациентите с чернодробна стеатоза е 5.3% (95 % CI: 0.1 – 26.0, $n = 1$), при пациентите с чернодробен карцином е 16.7% (95 % CI: 0.4 – 64.1, $n = 6$). OBI се счита важен рисков фактор при канцерогенезата според литературата. При проучване в Япония е установена 8 пъти по-висока честота на хепатоцелуларен карцином при пациенти с HBV DNA за 10-годишен период. Честотата на развитие на карцином е регистрирана на 5-ата година в 27% от случаите и развитие на онкологичното заболяване на 10-ата година – в 100% от случаите (Ikeda K et al., 2009). Според няколко проучвания при

пациенти с НСС, отрицателни за маркерите на HBV, се открива HBV DNA в серума и хепатоцитите (Kondo R et al., 2014; Lee SB et al., 2016).

Според изнесените от нас данни 20.0% (95 % CI: 8.2 – 21.6, n=1) от пациентите с диагноза лимфом са с OBI. По литературни данни реактивация на окултна HBV инфекция при тази група варира между 6% и 10% (Masarone M et al., 2014) и 21% – 28% (Watanabe M et al., 2011). Приема се, че HBV може да инфектира лимфоцитите, а интегрирането в генома на клетката може да доведе до свръхекспресия на клетъчните онкогени или до потискане експресията на тумор-супресорните гени. Вторият механизъм допуска ролята на хронична стимулация от вирусни антигени, без задължително заразяване на лимфоцитите. Предполага се и мултифакторен модел, с участието на други лимфотропни вируси, или на хронични антигенни стимули, лежащи в основата на автоимунни заболявания (Marcucci F et al., 2012).

Един пациент в нашето проучване е с тромбоцитопения и OBI – 100% (95 % CI: 25.0 – 100.0, n=1). По литературни данни намаляването на броя на тромбоцитите се свързва с хронично чернодробно заболяване и цироза, въпреки че подробният механизъм за взаимодействията на тромбоцитите с жизнения цикъл на HBV не е напълно изяснен (Vallet – Pichard A et al., 2007). В допълнение към участието на тромбоцитите в коагулацията на кръвта, все повече се коментира и тяхната роля да секретират хепатоцитен растежен фактор (HGF – hepatocytes growth factor), което има превантивна роля при чернодробна фиброза (Kodama T et al., 2010). Според нашите данни при изследване на пациентите с други болести (болест на Крон, Улцерозен колит, Холелитиаза) 13.9% (95 % CI: 8.2 – 21.6, n=16), въпреки суспектните данни, не открихме HBV DNA.

Разпространение на OBI в коинфекция или супер инфекция с HCV

В нашето проучване 4-ма от пациентите, изследвани за окултен хепатит, са хронични носители на HCV Ab. С лабораторни данни за OBI е един пациент – 5.6% (95 % CI: 0.1 – 27.3, n= 18). Отнася се за жена на 63 години с чернодробна цироза и HBV DNA вирусен товар 82 IU/mL.

При разпределение на пациентите в зависимост от пола, относителните дялове са еднакви (50%/50%) и в Хи-квадрат анализ не установихме статистически значими различия сред изследваните за HCV мъже и жени ($X^2 = 0.37$; $p=0.54$).

Обсъждане

Превалентността на OBI се различава твърде много в отделните региони по света. Изнесените данни варират от 1% до 87%, в зависимост чувствителността на използваните тестове, обем изходна серумна проба, както и в зависимост от използвания тест за количествено определяне на HBV DNA – Real-time PCR или Nested PCR (Makvandi M, 2016). Има значителен напредък в разбирането на молекулните механизмите, които са в основата на окултната HBV инфекция през последното десетилетие (Samal J et al., 2012). Вариации в HBV генома са свързани с мутации в „а“ детерминантата на HBsAg (A1762T/G1764A pre-S1 делеция, pre-S2 делеция, pre-S2 старт кодон мутация, АК замени), мутации след лечение (Lamivudine – свързани мутации). Мутации в pre-S региона на HBsAg се свързват с окултен хепатит В (Raimondo G et al., 2007). Освен на мутации в S гена, за появата на OBI се обсъждат още мутации в областта на *core promoter* (CP), като есенциален за вирусната транскрипция и регулация (Günter S, 2006).

Интеграцията на HBV DNA в генома на клетката хазаин и образуване на cccDNA, персистираща с години във вид на хроматинизирана епизома, промяна в имунния статус на макроорганизма, интерференция на HBV с други вируси, също се дискутират при патогенезата на OBI. Пренареждане на HBV DNA гените по време на интегриране в хромозомата може да доведе до загуба на HBsAg в серума, намаляване на производството на нови вириони и загуба на откриваема HBV DNA. Ето защо интеграцията на HBV DNA представлява ключов механизъм, който стои зад окултната HBV инфекция, особено след продължаваща няколко години хронична HBV инфекция (Nassal M, 2015). Интегрирана HBV DNA, а не епизомална

HBV DNA, често се открива при HBV, свързан хепатоцелуларен карцином (Raimondo G et al., 2010). По-висока честота на окултна хепатит В вирусна инфекция се открива при пациенти, инфектирани с HCV и HIV. Известни са многобройни проучвания, показващи понижен брой на репликативни междинни продукти на вируса на хепатит В при HCV коинфектирани индивиди (Chan HL et al., 2002).

Друг молекулярен механизъм, дискутиран при появата на ОВІ и свързан с АРОВЕСс (аполипопротеин В, иРНК ензимни каталитични полипептиди), е цитидин деаминиране (Nishikawa H et al., 2013). При хората тяхната функция е свързана със защита от вирусни инфекции. Ролята на АРОВЕС в инхибирането и редактирането на репликацията на HIV вируса е добре проучена (Hollinger FB et al., 2010). Впоследствие беше демонстрирана способността на АРОВЕС 3G да инхибира HBV репликацията. Експресията на АРОВЕС 3G в клетки, репликиращи HBV води до 50кратно намаляване на нивата на HBV ДНК (Vivekanandan P et al., 2008). В редки случаи ОВІ се дължи на недоказване на HbsAg поради недостатъчна специфичност на използвания тест (Brecht Cet al., 2001; Quarleri J, 2014; Yang I et al., 2016).

Окултната HBV инфекция се свързва в част от случаите с генетичната хетерогенност на вируса при заразяване с репликативно дефектни вируси или мутантни вируси (Pollicino T, 2014). Основно обаче се среща при репликативно-компетентни вируси, подтиснати от имунната система на макроорганизма (Raimondo G et al., 2007). Взаимодействията вирус – гостоприемник играят решаваща роля при изхода на хепатит В вирусната инфекция. Имунните отговори от страна на гостоприемника са свързани с участие във вирусния клирънс, вирусното персистиране и имунопатогенезата на HBV инфекцията. Интересното е, че няколко от имунните механизми, свързани с отговора на гостоприемника към вирусната атака, като апоптоза, цитолитични и нецитолитични Т-клетъчни отговори и витамин D рецептор свързани полиморфизми (VDR), водят до модулиране на репликацията на HBV и синтеза на HBV протеините (Mason WS et al., 2016). Потискащото действие на имунната система в тези случаи няма абсолютен ефект. Вирусът се реплицира и транскрибира в ниски стойности, продължително време, и при определени условия, като мощно имunosупресивно лечение, или при заболявания, водещи до потискане на имунната система, се наблюдава реактивация (Blackberg J, 2000; Onozawa M, 2005; Guidice CL et al., 2008; Raimondo G et al., 2008; Желев Д, 2009.). ОВІ се открива и в географски региони с ниска HBV ендемичност (Minuk GY et al., 2005).

Според литературните източници в Европа честота на окултен хепатит при пациенти с история за отминала HBV инфекция е 18% (Gonzales JM et al., 2015). Тези данни са близки до данните, получени в нашето проучване (15.7%). През 2008 година в Таормина (Италия), EASL приема, че серумните нива на HBV DNA при ОВІ са много ниски <1000 copies/mL (<200 IU/mL), като някои автори приемат условна горна граница под 15 500 IU/mL (Raimondo et al., 2010).

При един от пациентите, описани в нашето проучване, включен в групата с „фалшиво“ окултен хепатит В (мъж на 61 г.), HBV DNA е 453 188 IU/mL, което предполагаемо се дължи на мутация в S гена (escape мутация). По литературни данни с напредване на възрастта, най-вероятната причина за появата на „фалшиво“ окултен хепатит се асоциира с наличието на S мутации (Minuk GY, 2005). Тези мутации са отговорни за наличие на окултен хепатит В, реактивация на HBV, и невъзможност за регистриране на структурно променения HBsAg с конвенционалните тестове за неговото определянето (CDC, 1998; Samal J et al., 2012).

Най-голям относителен дял на HBV DNA положителните резултати според нашето проучване се наблюдава в по-напреднала възраст (61 – 70 г.). Това още веднъж потвърждава преимуществено хоризонталната трансмисия на инфекцията за България и заразяване в младежка и средна възраст. Такива данни са докладвани и от други автори за Европа (Raimondo G et al, 2007). HBV инфекцията се придобива в по-късна възраст (над 15 – 20 г.), предимно по сексуален път, при употреба на наркотици или кръвни манипулации. Тенденцията за възрастово разпределение се запазва и за окултния хепатит В (Allain JP,

2017). При изследваните от нас пациенти ОВІ с позитивиране на HBV DNA не се открива във възрастови диапазони 41 – 50 г. и 81 – 90 г. Относително най-много са лицата във възрастов диапазон 31 – 40 г., както и 61– 70 г. Това се свързва и с натрупването на рискови експозиции, подобно на разпространението на HBsAg положителните лица с високи нива на HBV DNA. Само един пациент, жена на 94 г., е с окултен хепатит В и чернодробна цироза.

В световната литература не намерихме много изнесени данни за връзката между пола и ОВІ. В намерените проучвания данните са разнородни. В едно проучване в Южна Африка, 1.67% от лицата с ОВІ са мъже. Според проучване в Западна Европа на малък брой случаи, мъжете са 100%. При проучване в Азия, положителните мъже са 62%, в Италия, Испания и Полша, мъжете съставляват 88% от случаите (Allain JP, 2017). В настоящото проучване открихме, че повод за изследване и данни за ОВІ се срещат предимно при мъжете и те съставляват 64.7% от случаите. Доминирането на мъжки пол може да се дължи на по-ефективната антивирусна активност на женската имунна и хормонална системи, но това предположение изисква да се проучи по-подробно.

Въпреки че нивата на чернодробните ензими не съответстват напълно на функционалното състояние на черния дроб и степента на неговото увреждане, те се използват в рутинната практика, и насочват вниманието на специалистите към евентуална чернодробна дисфункция. Най-важният ензим, суспектен за чернодробна дисфункция, е ALT. Според литературата и в клиничната практика след 1990 г. е определен праг за дефиниране на тласък на чернодробното заболяване, а именно 5-кратно и повече увеличаване на стойностите, или стойност над 200 IU/L (Chang ML et al., 2014). Пациентите с ОВІ в нашето проучване показват средна стойност над тази граница.

Редица проучвания сочат, че ОВІ е важен фактор в развитието и прогресията на хроничните чернодробни заболявания включително фиброза, цироза и хепатоцелуларен карцином (Marrero JA et al. 2004; Chemin I et al. 2005). По литературни данни около 20% от пациентите с хроничен хепатит развиват чернодробна цироза с трайна загуба на работоспособност и с нисък процент на преживяемост, а около 10% от тях – чернодробен карцином. Последните две крайни степени на хроничната HBV инфекция – чернодробна цироза и чернодробен карцином убиват около един милион души ежегодно (Whalley Aet al.,2001).

Механизмът на чернодробното увреждане в резултат на ОВІ все още се изяснява. Най-често в литературата се обсъжда персистирането на HBV DNA в хепатоцитите като интегрирана (двойно верижна, интрануклеарна) форма, или като епизомална (свободна, циркулярна, с ниско молекулно тегло, едноверижна, вътрецитоплазмена) форма (Mason WS et al., 2016). И двете форми могат да съществуват едновременно в един хепатоцит. Счита се, че интеграционният процес лежи в основата на антиген-носителството, хронично персистиращото носителство, хепатитната В вирусна цироза и е главна причина за възникването на хепатоцелуларния карцином. Открити са интеграционните места в HBV DNA към DNA на хепатоцита, като например човешкият теломеразен обратно транскриптазен ген (reverse transcriptase gene – RT gene), както и тумор-свързани гени, тумор-супресорни гени и други (Paterlini – Brechot P, 2003). В същото време експресията на HBx протеина намалява за сметка на синтеза на HBsAg и HBcAg (Samal Jet al., 2012). Счита се, че активната вирусна репликация е асоциирана с наличие на предимно епизомална вирусна DNA, а нискостепенната репликация – с интегрираната вирусна DNA. Случаите на краткотраен (1 – 2 години), хроничен хепатит се свързват предимно с наличие на епизомална вирусна DNA, докато случаите с продължителен (6 – 8 години) хроничен хепатит – с интегрирана, интрануклеарна вирусна DNA.

По данни на Националният център по здравна статистика на САЩ през 2005 г. при мъжете съществува 2 пъти по-висок риск да загинат от хронични чернодробни заболявания и цироза (Rogers RG et al.,2010). Изнесените от нас данни за пациентите с чернодробен карцином показват, че заболяването се среща, по-често при мъже (n=3), отколкото при жени (n=2), като отчитаме малкия брой изследвани лица (n=5). По литературни данни НСС е най-често срещаният чернодробен тумор, като повечето автори докладват за 3 до 4 пъти по-често засягане на мъжете в сравнение с жените, а преживяемостта е еднаква при двата пола (El –

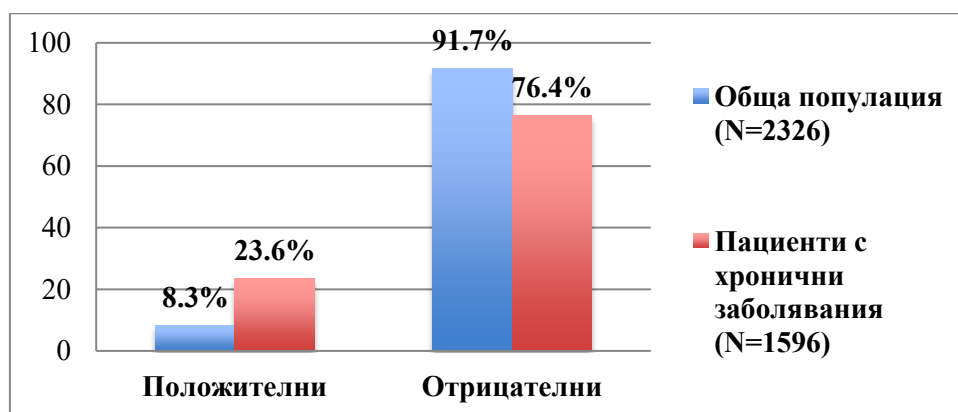
Serag HB et al., 2003). Ретроспективен анализ на информацията от американската онкологична база данни, обхващаща 7000 пациента, от 1977 до 1996 е отчетена еднаква преживяемост в рамките на 1 година – 23% (95% CI: 21% – 24%) (El – Serag HB et al., 2001). Различията в честотата на НСС при двата пола патофизиологично се дължат на факта, че това е андрогенчувствителен тумор. Андрогените активират вирусния онкогенен потенциал. Според едно проучване в Америка е установено, че естрогените намаляват секрецията на Interleukin-6 от купферовите чернодробни клетки при мишки. Това намалява риска от развитие на НСС (Naugler WE et al., 2007).

HBV и HCV имат еднакъв механизъм на вирусна трансмисия и това е едно от обясненията за високата честота на ОВІ при пациенти с HCV (Nishikawa H et al., 2013). По литературни данни при пациенти с HBV/HCV конфекция поради конкурентно взаимодействие HBsAg се негативира 2.5 пъти по-често, отколкото при моноинфекция (Wu Cet al., 1995; Tsatsralt B et al., 2006). При повечето едновременно инфектирани пациенти репликацията на HBV се инхибира от HCV. Установено е, че HCV core протеинът и неструктурните протеини (NS2 и NS5A) взаимодействат с HBx протеина, който е трансактиватор на HBV промоторите. Като резултат настъпва инхибиране на вирусната HBV транскрипция (Vivekanandan P et al., 2008). Според тези проучвания, HCV е най-важният хепатотропен вирус за HBsAg клирънса при пациенти с хроничен хепатит В (Morales – Romero J et al., 2014). По данни от литературата при около 1/3 от пациентите с хронична HCV инфекция се открива HBV DNA в отсъствие на HBsAg (Raouf HE et al., 2015), както в нашето проучване. Наличието на ОВІ при пациенти с HCV повишава и риска от развитие на хепатоцелуларен карцином. Изнесените данни за честотата на HCV сред окултните HBV носители ни доближава до информацията изнесена и от други автори. При 53 пациенти с хронична HCV инфекция 7.5% (n=4) са с данни за ОВІ (Khatab E. et al, 2005). Според Chen et al (2010), от изследваните 126 пациента, този дял е 5% (n=6). Други автори (Kishk R et al., 2014) доказват по-нисък процент (1.85%) от 162 изследвани пациенти.

Въпреки по-малкия брой изследвани пациенти за съпътстващо носителство на anti-HBs Ab (n=36) при пациентите суспектни за ОВІ, относителният дял на позитивните според нашите резултати съвпада с данни от литературата. Според Chen YC et al, 2010, серопозитивен ОВІ се наблюдава при около 50% от пациентите. По отношение на изнесените от нас данни при нито един от тях не доказахме откриваема HBV DNA, вероятно поради малкия брой изследвани лица. Нашите данни потвърждават тези от литературните източници за по-бенигнено протичане на HBV инфекцията при жените, като причината за това са половите хормони – андрогени и естрогени, а не толкова факторите на околната среда и начина на живот (Weber B et al., 2001).

4.3.4. Сравнителен анализ на резултатите от изследване на лицата от случайно подбрана популация и пациентите с хронични заболявания и чернодробна дисфункция. Оценка на използваните методи

Нашите данни в скрининговите проучвания в ELISA на двете групи лица показват разлика в относителните дялове на разпространение anti-HBs Ab положителни лица в обща популация и при пациенти с хронични заболявания и чернодробна дисфункция (Фиг. 35).



Фигура 35. Относителен дял на anti-HBc положителни лица в обща популация и при пациенти с хронични заболявания и чернодробна дисфункция

Получените положителни резултати (23.6%) при изследване на пациенти с различни хронични заболявания и чернодробна дисфункция са значително по-високи от тези при лицата в обща популация (8.25%). При сравняване на anti-HBc total положителните резултати в двете популации в Хи-квадрат анализ, установихме статистически значима разлика ($\chi^2=180.2$; $p<0.001$). Хроничните заболявания и имunosупресията при тези пациенти активират латентните инфекции, маркер за което са съответно раздвижените серумни трансминази, по повод на което е търсено изследване за скрито носителство на хепатит В.

При клинично здрави лица, този процент е много по-нисък. Ако не са изложени на множество реинфекции с HBV или имunosупресия, при тези лица могат да не се откриват абнормности, което не дава повод за изследване и търсене на заразеност с HBV.

Изчислихме съотношението между anti-HBc Ab отрицателни /anti-HBc Ab положителни лица в изследваните популации. Честотата на anti-HBc Ab положителните лица в популацията на пациентите с хронични чернодробни заболявания е по-висока (всеки 3-ти пациент), в сравнение с обща популация, където anti-HBc Ab положително е всяко 11-то лице (Табл.33).

Таблица 33. Съотношение между anti-HBc Ab отрицателни /anti-HBc Ab положителни лица в изследваните популации

	Брой N=2326	Съотношение +/-	Брой N=1596	Съотношение +/-
Положителни (+)	192	1/11	377	1/3
Отрицателни (-)	2134		1219	

Изчислихме и хипотетичния популационен риск за проява на ОВІ, ако всички лица са изследвани освен в ELISA и в PCR (Табл.34). Хипотетичният популационен риск за проява и развитие на окултен хепатит В сред пациенти с хронични заболявания и чернодробна дисфункция е по-висок от този сред пациенти от обща популация. Според нашите данни от изследваните 3 922 лица, 40.7% (95% CI: 39.2 – 49.3, n= 1596) са пациентите с чернодробна дисфункция. Изследваните лица в обща популация са 59.3% (95% CI: 57.7 – 60.8, n=2326). Хипотетичният популационен риск за придобиване и проява на ОВІ е изчислен на базата на цитираните в литературата относителни дялове за окултен хепатит сравнително в обща популация и при пациентите с хронични заболявания и чернодробна дисфункция. В проучваната в дисертационния труд популация 40.7% са пациентите с хронични чернодробни заболявания, което комбинирано с факта, че риска за развитие на ОВІ в нашето проучване в Real time PCR е 15.7% дава общ популационен риск от 6.4%

Таблица 34. Хипотетичен популационен риск за развитие на окултен хепатит В (ОВІ) при пациенти с хронични чернодробни заболявания (n=1596) и пациенти в обща популация (n=2326).

	Изчислен относителен дял за окултен хепатит	Честота на окултен хепатит В в популацията
Пациенти с хронични чернодробни заболявания 40.7%	15.7% (Tsaneva D. et al., 2018)	6.4%
Лица изследвани в обща популация 59.7%	2.4% (Martinez M et al., 2015)	1.4%

По литературни данни ОВІ се среща в 2.4% от индивидите в обща популация (Martinez M et al., 2015), което определя общ популационен риск за проява на окултен хепатит В в 1.4% от лицата. Този риск е 4.6 пъти по-малък, отколкото при пациентите с хронични заболявания и чернодробна дисфункция. В проучената популация с хронични заболявания и чернодробна дисфункция (n=115), окултни носители на хепатит В в Real-time PCR са 15.7%. Тези данни съвпадат с данните, изнесени в литературата, според които ОВІ се среща при 4% до 25% от anti-HBc Ab позитивните пациенти (Gonzales JM 2015). На тази база можем да предположим, че ако направим тестване за наличие на HBV DNA в PCR на всички HBsAg негативни, anti-HBc Ab позитивни (n=377) пациенти, хипотетично 59 ще бъдат пациентите с окултен хепатит В.

Заклучение

Инфектираността с HBV се доказва скринингово с помощта на серологични маркери, като наличието на anti-HBc total Ab е един от най-чувствителните показатели, дефиниращ това състояние. Нашите резултати от проучване на голям брой HBsAg негативни лица за наличие на anti-HBc total (n=2326) в случайно подбрана популация показва носителство в 8.25% (95% CI:7.2 – 9.4, n=192) в ELISA. В сравнителен аспект при пациенти с различни хронични заболявания и данни за чернодробна дисфункция (n=1596), този процент в същия метод е 23.62% (95% CI: 21.6 – 25.8, n=377). По литературни данни повечето налична информация по отношение на окултното носителство на HBV се набавя първоначално при скринингово или диагностично тестване на серумни проби с имуноензимни методи (Urbani S, 2010).

Серологичните тестове вероятно не заместват напълно PCR технологията, но дават една стартова представа за разпространението на ОВІ в конкретно изследваната популация. Въпреки че не са идеалният маркер, anti-HBc антителата могат да се използват като заместващ такъв в отсъствие на HBV DNA тестове, за да се идентифицират потенциални серопозитивни ОВІ индивиди. Особено полезен е, когато става въпрос за донори на кръв, тъкани и органи, пациенти с неидентифицирано хронично чернодробно заболяване или при пациенти, подложени на имunosупресивна терапия. При сравняване на данните получени при изследване на лица в обща популация и тези при пациенти с хронични заболявания и чернодробна дисфункция става ясно значително по-високия относителен дял на положителните резултати при пациентите с чернодробна дисфункция.

В нашето проучване голяма част от пациентите са с хроничен хепатит и цироза, HBsAg отрицателни, както и имunosупресирани пациенти. Всички тези състояния, при отрицателни лабораторни резултати за останалите причинители на хроничен хепатит, активират латентния HBV в много по-висока степен, отколкото при лицата в обща популация, които нямат клинични данни. Това рефлектира и върху разликата в степента на популационен риск в двете изследвани популации (6.4% срещу 1.4%). Според нашите данни за обща популация, всяко 11-о лице вероятно е anti-HBc total Ab позитивно, докато в групата на пациентите с хронични заболявания и чернодробна дисфункция – всеки 3-ти пациент. Тези данни за Североизточна

България показват необходимостта от изследване носителството на този серологичен маркер като показателен за търсене на скрита HBV инфекция, която е с продължителни неблагоприятни последици за пациента.

Нашите резултати показват, че anti-HBc total Ab положителен резултат, особено при рискови пациенти, подготвяни за трансплантация, донори на органи и тъкани трябва много внимателно да се интерпретира. Респективно трябва да се направи количествено изследване на вирусния товар в Real-time PCR.

В нашето проучване са включени пациенти със серопозитивен вариант на OBI, които по литературни данни съставляват около 80% от случаите OBI. В около 20% от случаите е налице вариант на OBI в отсъствие на HBV серумни маркери, но с позитивен PCR резултат (серонегативен OBI). Серонегативните индивиди вероятно са загубили специфичните антитела в хода на инфекцията или са останали отрицателни поради ниска доза на инфекция. В бъдещи проучвания, с по-широко въвеждане на PCR метода в лабораторната вирусологична практика, HBV DNA трябва да се търси и в периферни мононуклеарни клетки и в биопсичен материал от черен дроб.

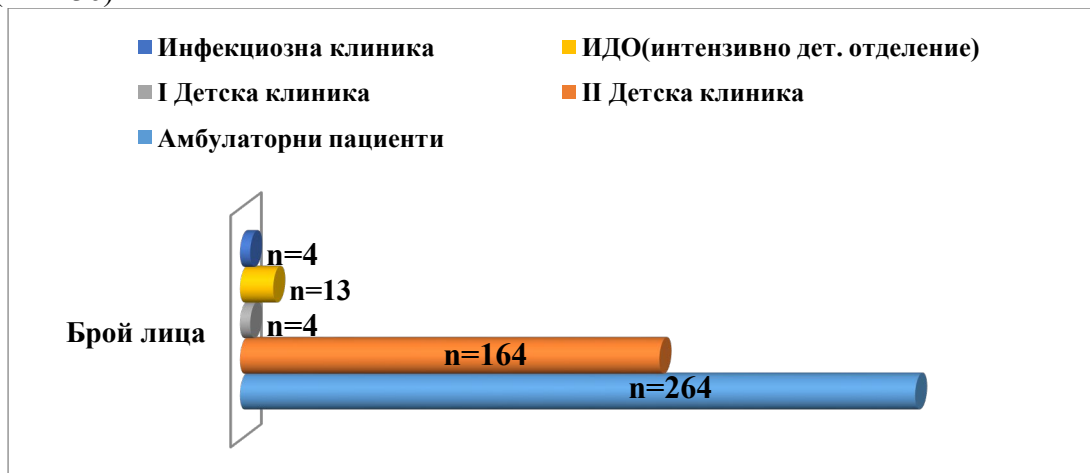
Литературните данни показват, че нивото на HBV DNA и доказаните случаи на OBI е по-високо при anti-HBc total Ab позитивните, anti-HBs Ab негативни индивиди, както в нашето проучване. В тези случаи вероятността за трансмисия на инфекцията към чувствителни реципиенти или за реактивация е много по-голяма (Hollinger FB et al. 2010). Видът и чувствителността на използваните тестове също е от много голямо значение.

4.4. Проучване продължителността на имунния отговор при ваксинирани за HBV лица в обща популация на възраст 6 м. – 20 г. в Североизточна България

Изследване на имунния anti-HBs Ab отговор при имунизирани лица в ELISA. Сравняване на резултатите в зависимост от възрастта и пола

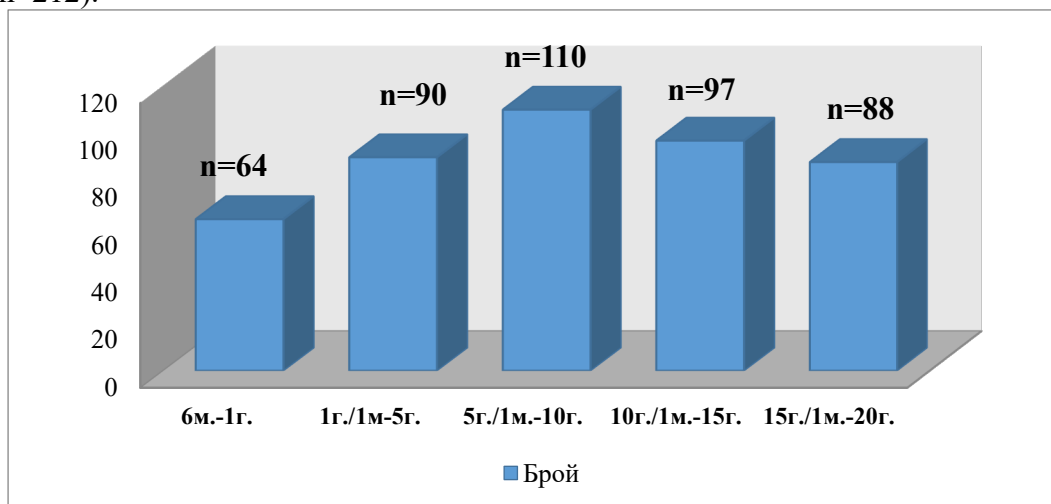
Описание на извадката

Всички включени индивиди са родени в периода 1999 – 2018 г. и са обхванати от задължителната ваксинационна програма срещу хепатит В, въведена в България от 1991 г. От анализа са изключени лицата, които не отговарят на критериите за включване, а именно без данни позволяващи статистическа обработка, както и тези с HBsAg и anti-HBc total Ab положителен резултат, както и лица с приложена бустер доза от ваксината. От проучването са изключени и лицата, чиито престои в инфекциозните клиники са във връзка с прекаран остър вирусен хепатит. За целта на проучването по серологичния маркер anti-HBs Ab са изследвани 449 серумни проби, които представляват 3.2% (95% CI: 2.9% – 3.5%) от всички включени в дисертационния труд. От тях, изследвани амбулаторно са 58.5% (95% CI: 54.1% – 63.4%, n=264). Пробите от клиниките на УМБАЛ „Св.Марина“ са 41.2% (95% CI:36.6% – 45.9%, n=185) (Фиг. 36).



Фигура 36. Разпределение на изследваните пациенти

Изследваните лица са разделени в 5 възрастови групи: 1-ва група (6 м. – 1 г.) – 14.3% (95% CI:11.2% – 17.8%, n=64); 2-ра група (1 г. 1 м. – 5 г.) – 20.0% (95% CI:16.4% – 24.1%, n=90); 3-та група (5 г. 1м. – 10 г.) – 24.5% (95% CI: 20.6% – 28.7%, n=110); 4-та група (10 г. 1 м. – 15 г.) – 21.6% (95% CI: 17.9% – 25.7%, n=97); 5-а група (15 г. 1 м. – 20 г.) – 19.6% (95% CI: 15.9% – 23.3%, n=88) (Фиг. 37). Относителният дял на изследваните жени – 52.8% (95% CI: 48.0% – 57.5%, n= 237) е по-висок от относителния дял на изследваните мъже – 47.2% (95% CI: 42.5% – 52.0%, n=212).



Фигура 37. Разпределение на изследваните лица в периода 2010 – 2018 г. в зависимост от възрастта (n=449)

Резултати

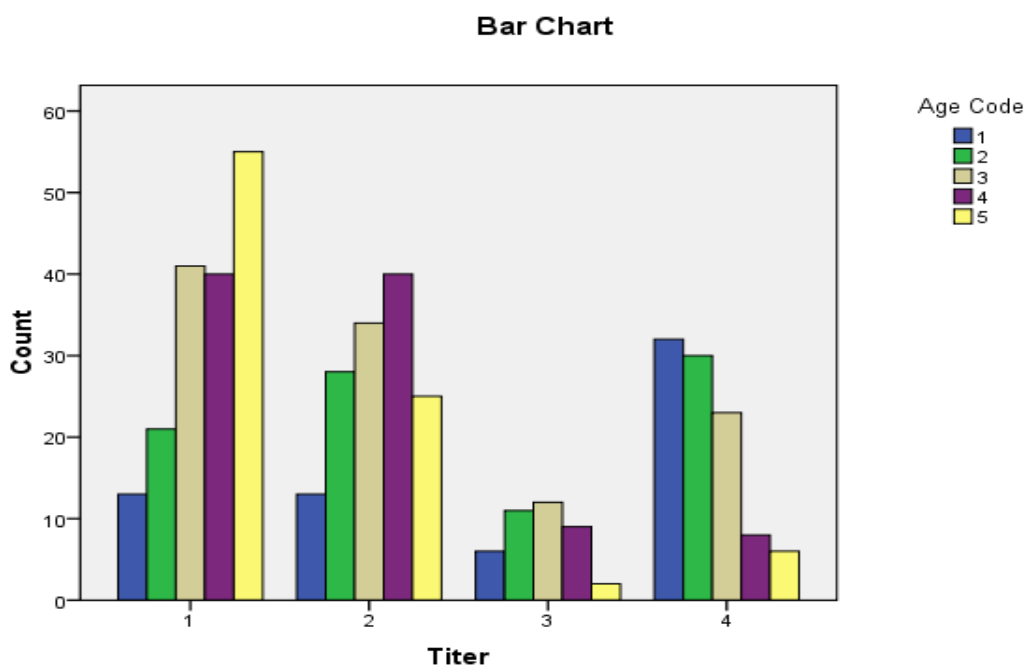
Получените резултати са обобщени за целият период (2010 – 2018 г.) на наблюдение. При разпределение на изследваните лица в 5 възрастови интервала установихме наличие на имунен отговор в почти всички възрастови групи. Най-висок относителен дял позитивни лица установихме във възрастов интервал 6 м. – 15 г. (Табл. 35).

Таблица 35. Разпределение на лицата в зависимост от възрастта и титъра на anti-HBs антитела

			Възраст					Общо
			6м./1 г.	1г./1м. – 5г.	5г./1м. – 10г.	10г./1м. – 15г.	15г./1м – 20г.	
Anti-HBs Ab	Имунен отговор (<10mIU/mL)	Брой	13	21	41	40	55	170
		%	20.3%	23.3%	37.3%	41.2%	62.5%	37.9%
	Имунен отговор (10 – 50 mIU/mL)	Брой	13	28	34	40	25	140
		%	20.3%	31.1%	30.9%	41.2%	28.4%	31.2%
	Имунен отговор (50 – 100 mIU/mL)	Брой	6	11	12	9	2	40
		%	9.4%	12.0%	10.9%	9.3%	2.3%	8.9%
	Имунен отговор (>100 mIU/mL)	Брой	32	30	23	8	6	99
		%	50.0%	33.3%	20.9%	8.2%	6.8%	22.0%
Общо	Брой	64	90	110	97	88	449	
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	

Най-малък е относителният дял на лицата, при които не се доказва имунен отговор във възрастов диапазон 6 м. – 1 г. – 20.3% (95% CI: 11.3% – 32.2%, n=13), а най-голям – във възрастов диапазон 15 г. 1м. – 20 г. – 62.5% (95% CI: .5% – 72.6%, n=55). Най-висок относителен дял изследвани лица с имунен отговор >100 mIU/mL доказахме във възрастов диапазон 6 м. – 1 г. – в 50.0% от всички включени в групата (95% CI: 7.2% – 62.8%, n=32), а най-малък – във възрастов диапазон 15 г. 1 м. – 20 г. – 6.8% (95% CI: 5% – 14.3%, n=6). Разликата в относителните дялове на позитивните лица с най-добър имунен отговор между двете крайни възрастови групи е статистически значима и при прилагане на Хи-квадрат анализ ($\chi^2=81.98$; $p<0.01$). В корелационен анализ на Спирман също се установи значима асоциативна, но обратнопропорционална връзка между възраст и величина на имунния отговор ($r=-0.337$, $p=0.001$) потвърждаваща, че с увеличаване на възрастта, поствакциналният имунен отговор намалява или става неоткриваем в серологичните тестове.

Съгласно обобщената информация от приложената таблица разпределението лицата по възраст и титър на anti HBs Abe е представено на Фиг. 38. Лицата са разпределени в зависимост от титъра на anti-HBs Ab (абсциса на графиката) в 4 групи. Лица с имунен отговор <10mIU/mL (1), с имунен отговор 10 – 50 mIU/mL (2), с имунен отговор 50 – 100 mIU/mL (3), с имунен отговор >100 mIU/mL (4). С възрастов код (age code) 1 са отбелязани лицата от възрастов диапазон 6 м. – 1 г., с код 2 – тези в диапазон 1 г. 1 м. – 5 г., с код 3 – тези в диапазон 5 г. 1 м. – 10 г., с код 4 – тези в диапазон 10 г. 1 м. – 15 г., с код 5 – тези в диапазон 15 г. 1м. – 20 г.



Фигура 38. Възрастово разпределение на изследваните лица в зависимост от anti-HBs Ab титъра

*Titer – Титър; Count – Брой; Age – Възраст

С цел да демонстрираме промяната в постимунизационния титър на антителата срещу хепатит В с възрастта за цялата извадка (n=449), разделихме изследваните лица в две групи: 6 м. – 1 г. и 1 г. 1 м. – 20 г. (Табл. 36).

Таблица 36. Разпределение на лицата в зависимост от титъра на anti-HBs Ab до 1 г. и след 1 г. (период 2010 – 2018 г.)

2010-2018 г.			Титър на anti-HBs антителата				Общо
			Липса на имунен отговор (<10mIU/mL)	Слаб имунен отговор (10-50 mIU/mL)	Добър имунен отговор (50-100 mIU/mL)	Много добър имунен отговор (>100 mIU/mL)	
2010-2015г.	0.6г/1г.	брой	2	6	1	15	24
		%	1.0%	3.0%	0.5%	7.5%	12.0%
	Над 1г.	брой	58	74	18	26	176
		%	29.0%	37.0%	9.0%	13.0%	88.0%
	Общо	брой	60	80	19	41	200
		%	30.0%	40.0%	9.5%	20.5%	100.0%
2016г.	0.6г/1г.	брой	6	3	2	4	15
		%	6.6%	3.3%	2.2%	4.4%	16.5%
	Над 1 г.	брой	42	18	2	14	76
		%	46.2%	19.8%	2.2%	15.4%	83.5%
	Общо	брой	48	21	4	18	91
		%	52.7%	23.1%	4.4%	19.8%	100.0%
2017г.	0.6г/1г.	брой	5	3	1	10	19
		%	3.9%	2.3%	0.8%	7.8%	14.8%
	Над 1г.	брой	45	30	11	23	109
		%	35.2%	23.4%	8.6%	18.0%	85.2%
	Общо	брой	50	33	12	33	128
		%	39.1%	25.8%	9.4%	25.8%	100.0%
2018г.	0.6г/1г.	брой	0	1	2	3	6
		%	0.0%	3.3%	6.7%	10.0%	20.0%
	Над 1г.	брой	12	5	3	4	24
		%	40.0%	16.7%	10.0%	13.3%	80.0%
	Общо	брой	12	6	5	7	30
		%	40.0%	20.0%	16.7%	23.3%	100.0%
Общо	0.6г/1г.	брой	13	13	6	32	64
		%	2.9%	2.9%	1.3%	7.1%	14.3%
	Над 1г.	брой	157	127	34	67	385
		%	35.0%	28.3%	7.6%	14.9%	85.7%
	Общо	брой	170	140	40	99	449
		%	37.9%	31.2%	8.9%	22.0%	100.0%

С помощта на Хи-квадрат анализ установихме статистически значима връзка между количеството на антителата и възрастта на лицата в двете възрастови групи (до 1 г. и след 1 г.) за целия период на проучването ($\chi^2=35.36$, $p=0.00$, $p<0.05$) по години (Табл. 37). Резултатите потвърждават ефективността на ваксината срещу хепатит В на популационно ниво до 1-годишна възраст. Постепенно с напредване на възрастта се наблюдава спад в количеството на протективните anti-HBs антитела.

Таблица 37. Anti-HBs антитяло титър при лица до 15 г. и в диапазон 15 г. 1 м. – 20 г.

			Възраст (години)		Общо
			До 15г.	Над 15г.	
Anti-HBs антитела	Отрицателен (<10 mIU/mL)	брой	118	51	169
		%	32.3%	60.7%	37.6%
	Положителен (>10 mIU/mL)	брой	247	33	280
		%	67.7%	39.3%	62.4%
Общо		брой	365	84	449
		%	100.0%	100.0%	100.0%

От изложените по-горе резултати можем да обобщим, че с положителен антитяло отговор до 1 г. са 79.7% от лицата (n=51), във възрастов диапазон 1 г.1 м. – 15 г. относителния дял на anti-HBs положителните е 70.0% (n=196) и в диапазон 15 г. 1 м. – 20 г. относителния дял на anti-HBs положителните е 39.3% (n=33).

Полово свързана характеристика на изследваните лица и anti-HBs имунния отговор

Разпределението на anti-HBs антитяло отговора в зависимост от пола е представено в Табл. 38.

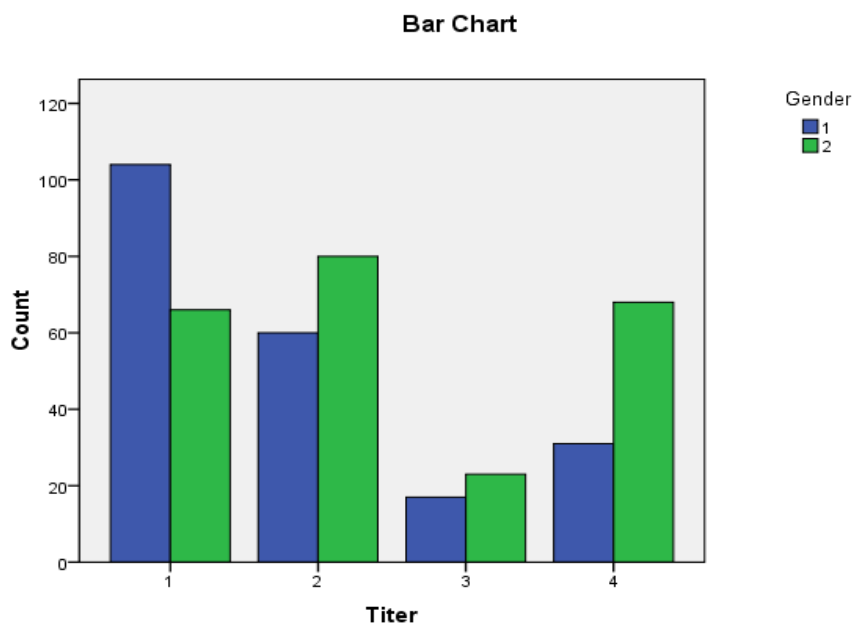
Таблица 38. Разпределение на лицата по пол и имуен отговор

			Пол		Общо
			Мъже	Жени	
Anti-HBs Ab	Отсъствие на имуен отговор (<10mIU/mL)	Брой	104	66	170
		%	49.1%	27.8%	37.9%
	Имуен отговор (10-50 mIU/mL)	Брой	60	80	140
		%	28.3%	33.8%	31.2%
	Имуен отговор (50-100 mIU/mL)	Брой	17	23	40
		%	8.0%	9.7%	8.9%
	Имуен отговор (>100 mIU/mL)	Брой	31	68	99
		%	14.6%	28.7%	22.0%
Общо		Брой	212	237	449
		%	100.0%	100.0%	100.0%

Отсъствие на имуен отговор се среща по-често при мъжете – 49.1% (95% CI: 42.1% – 56.0%, n=104), в сравнение с жените – 27.8% (95% CI: 22.2% – 34.0%, n=66). Имуен отговор 10 mIU/mL – 50 mIU/mL се среща в по-висок процент при изследваните жени – 33.8% (95% CI: 27.8% – 40.2%, n=80). Имуен отговор от 50 – 100 mIU/mL се среща в по-висок процент също при жените – 9.7% (95% CI: 6.3% – 14.2%, n=23) в сравнение с мъжете – 8.0% (95% CI: 4.7% – 12.5%, n=17). Имуен отговор над 100 mIU/mL доказахме доминантно при жените – 28.7% (95% CI: 20.3% – 34.9%, n=68), в сравнение с мъжете – 14.6% (95% CI: 10.2% – 20.1%, n=31). Резултатите от Хи-квадрат анализа за целия период на наблюдение показаха, че различията в anti-HBs Ab имунния отговор по пол са значими. Лицата от женски пол имат по-добър отговор след ваксинация в сравнение с мъжете, като връзката между пол и количество anti-HBs Ab е статистически значима ($\chi^2= 24.76$, $p<0.01$).

Разпределението на лицата в зависимост от титъра на anti-HBs Ab и пола е представено на Фиг. 39, където мъжете са отбелязани с код 1, а жените – с код 2. Отсъствие на имуен

отговор (<10mIU/mL) е отбелязано с код (1), имунен отговор (10mIU/mL – 50 mIU/mL) – с код (2), имунен отговор (50mIU/mL – 100 mIU/mL) – с код (3) и имунен отговор (>100 mIU/mL) с код (4).



Фигура 39. Разпределение на лицата в зависимост от пола и anti-HBs Ab титъра

Обсъждане

Намаляването на разпространението на HBV инфекцията в световен мащаб е факт, постигнат успешно посредством имунизационните програми в отделните държави. Ваксината срещу HBV се прилага в 20 от 27-те страни в Европейския съюз (Schweitzer A. et al., 2015). Задължителна ваксинация на новородените в България се извършва от 01.08.1991 г. (Теохаров П и съавт., 2006; Тодорова Т и съавт., 2016). През 2001 г. по проекта EUROHEP са ваксинирани 93% от новородените в България (Коцев И, 2013). В България хепатит В ваксините започват да се прилагат през 1988 г., като от самото начало се използват само рекомбинантни HBV ваксини (Теохаров П и съавт., 2006).

Остава открит въпросът за продължителността на поствакциналния имунен отговор. Нашите данни показват значително намаляване на позитивните лица след 15-годишна възраст. Въпреки препоръките на СЗО (WHO, 2015), серологичното тестване на лицата за наличие на anti-HBs антителата 1 до 2 месеца след завършване на основната схема за ваксиниране не се извършва като рутинна практика (Ivanova, et al. 2013). Липсата на информация относно имунния отговор след първата имунизационна схема прави интерпретацията на неоткриваемото ниво на anti-HBs (<10mIU/mL) години след приключване на имунизацията, трудна. Лицата с ниски титри на anti-HBs, както и неотговорилите на ваксината, са с висок риск от инфекция с HBV, вариращ от 5% до 32% (Averhoff F et al., 1998; Barash C et al., 1999). Според литературни данни 5% – 14% от възрастните лица в обща популация не отговарят на стандартната ваксинационна схема срещу HBV поради различни рискови фактори (Kubba AK et al., 2003). Рискови фактори за неадекватен anti-HBs отговор са инжектиране в седалищните вместо в делтоидния мускул, мъжки пол, затлъстяване, тютюнопушене, по-възрастни лица, имunosупресия и специфични HLA хаплотипове (Ivanova L., et al., 2013). Според литературните източници рискът от развитие на HBV инфекция след дори единична експозиция с инфектирана кръв или други телесни течности варира от 6% до 30% при неваксинирани лица (Zeeshan M, et al., 2007).

Концентрацията на антителата към HBsAg се оценява в диапазона > 10 mIU/mL (IU/L) до > 100 mIU/mL (IU/L) (Puro V et al., 2005). Някои автори приемат стойността от 10 mIU /mL,

като защитна съгласно европейските препоръки (Roggendorf M et al., 2007). Други автори приемат по-високо референтно ниво – 100 mIU/mL и над 100 mIU/mL (Kane M, et al., 2000; Heining U et al., 2010), особено когато ваксината се прилага за защита при професионален риск от заразяване с кръв и кръвни продукти. Индивиди с anti-HBs Ab <10 mIU/mL (IU/L) след имунизационната програма се считат за неотговарящи. При имунен отговор под тези стойности са наблюдавани отделни случаи на непоявена инфекция (Аргирова Р, 2004; Rao V et al., 2008). Лицата с anti-HBs Ab стойности между 10mIU/mL (IU/L) – 99 mIU/mL (IU/L) се считат за индивиди с недостатъчно изработени антитела за дългосрочна защита (Bundesamt für Gesundheit, 2009). Лицата със стойности >100 mIU/mL (IU/L) се считат за защитени срещу HBV инфекция (MacLachan J et al., 2015). Според данните от литературата (Kane M et al., 2000), първите две дози ваксина обикновено са достатъчни за започване производството на анти-HBs Ab, като по този начин подготвят имунната система за вторичен имунен отговор. Третата доза ваксина стимулира вторичния имунен отговор и в резултат се постигат по-високи титри на анти-HBs Ab. При кърмачета процентът на изработилите anti-HBs антитела е по-висок и достига 95% – 100% (WHO, 2015).

Нашите данни показват имунен отговор при децата до 1-годишна възраст в близо 80%. Здравите възрастни индивиди изработват anti-HBs \geq 10mIU/mL в 80% – 90% по литературни данни (Meireles L. et al., 2015). Повечето автори изтъкват, че защитният ефект от имунизацията е с продължителност 10 – 15 г. след пълна трикратна доза ваксина (Nathanson N et al., 2007; Ni YH et al., 2012). Някои автори цитират в проучванията си, че след 20 години от проведената ваксинация 37.0% от участниците имат защитни нива на anti-HBs антителата \geq 10mIU/mL (Bagheri – Jamebozorgi et al., 2014). След 5 до 15-годишна възраст около 50% от лицата, които преди това са отговорили след пълна серия ваксина, имат ниски или неоткриваеми anti-HBs Ab (Mast E, 2004). Според нашите данни близо 60% от лицата след 15-годишна възраст нямат откриваеми anti-HBs Ab. С цел по-задълбочено проучване продължителността на антитяло отговора, са необходими допълнителни проучвания за определяне на продължителността на имунологичната памет, както и подходящото време за апликация на бустер доза от ваксината (Pernis AB, 2007). При част от имунизиранията лица нивото на протективните антитела спада под откриваемото ниво. В тези случаи еднократна (booster) доза ваксина може да провокира мощен имунен отговор, поради съществуващата имунологична памет в лимфоцитите.

Според данни на McMahon BJ et al., 2005 и Bialek SR et al., 2008, величината на постимунизационния anti-HBs Ab титър е най-силният предиктор на загубата на антитела, като лицата с много добър отговор на ваксината (>100mIU/mL) имат по-малък риск да ги загубят на 15-ата година (76.5%) и 18-тата година (66.7%) след ваксинация. В някои проучвания (Zanetti AR et al., 2005), първичният курс на ваксинация в ранна детска възраст или юношество осигурява продължителна защита и анамнестичен отговор присъства при 96 % – 97% от лицата, които са получили бустер доза ваксина. Според Gold Y. et al., (2003), с нарастване на възрастта, серопротективното ниво на антителата се понижава, и най-значително намаление настъпва 5 – 8 г. след ваксинацията. Behre U et al., (2012), в проучване в Германия сред новородени, получили и трите дози рекомбинантна ваксина установяват титър на anti-HBs Ab >10mIU/mL в 83.8% на 5-а година след имунизацията и на 10-ата година – в 78.3%.

Според нашите данни 24.1% от лицата след 5-ата година нямат откриваеми anti-HBs Ab, като това ниво се запазва и до 10-ата година след ваксинацията. Според едни автори anti-HBs Ab персистират до края на живота в повече от 80% от пациентите и свидетелстват за имунитет срещу реинфекция, като те са единствените протективни антитела, синтезирани от имунната система срещу повърхностните вирусни белтъци (Karoo R. et al., 2014). Според други автори (Banatvala JE et al., 2003; Van Damme P et al., 2007) имунологичната памет продължава повече от 12 години след имунизацията и е налице доказателство за голямо и бързо увеличение на титъра на антителата след бустер имунизация, дори при лица, които са загубили своите антитела. Броят на В лимфоцитите от имунологичната памет, които са способни да произвеждат anti-HBs Ab не намалява, заедно с нивото на антителата, като процента на защита 6.5 години след ваксинацията е 85% (Ivanova L et al., 2013).

Нашите резултати показват отчетливо по-добър имунитет сред жените в сравнение в мъжете. Данните, които открихме в литературата в по-голямата си част подкрепят тази теза. Още според Fang JW(1994) става ясно, че както при много други ваксини, по-високи нива на антитела се получават при жените, отколкото при мъжете. Според Fernandez – Bernal F et al. (2011) мъжете имат намалена реакция към конвенционалните ваксини срещу хепатит В (Fernandez – Bernal F et al., 2011). Посочват се различни механизми, обясняващи преимуществено по-адекватния имуноен отговор при жените.

Много литературни източници сочат, че както вродените, така и адаптивните имунни отговори се различават между половете след излагане на имунологични стимули. Fink et al., 2015 изнасят данни, че мъжете и жените имат различни нива на хормони, които се променят с течение на времето, което допълнително засяга способността на дадено лице да реагира при ваксинация. Както при хората, така и в животински модели, повечето проучвания обикновено използват млади индивиди, без да обръщат внимание на това дали сексуалните различия в имунната функция се променят в хода на живота. Изследванията, проведени с използване на мишки показват, че в отговор на различни антигени и патогени, активността на рецепторите за разпознаване на стимула (Pattern recognition model – PRRS), производството на възпалителни протеини (напр. α -IFN, γ -IFN, TNF α), антигенното представяне и фагоцитния капацитет на макрофагите се регистрират с по-висока активност при жените, отколкото при мъжете (Fish EN, 2008).

Преобладава хипотезата, че имунологичните разлики между половете се дължат на половите стероиди, особено тестостерона, естрадиола и прогестерона, които влияят върху функционирането на имунните клетки. Стероидите променят функционирането на имунните клетки посредством свързване със специфични рецептори, които се експресират в различни лимфоидни тъканни клетки, както и в циркулиращи лимфоцити, макрофаги и дендритни клетки (Kovats S et al, 2010). Свързването на стероидите със съответните стероидни рецептори директно влияе върху клетъчните сигнализиращи пътища, което води до диференциално производство на цитокини и хемокини (Pernis AB, 2007). В допълнение към хормоналните влияния, генетичните и епигенетичните фактори допринасят за различията в имунния отговор към ваксинацията срещу хепатит В, основаващи се на пола (Klein SL et al., 2015). Голям брой гени, кодиращи протеини, свързани с имунната система, се намират върху хромозомата X (Fink Aet al., 2015). Редица транскрипционни и транслационни ефектори, които функционират надолу по веригата на активираните рецептори, също са кодирани върху X хромозомата. Като се има предвид, че мъжете имат XY хромозоми, а жените – XX, всякакви увреждащи мутации или полиморфизми към X-свързаните гени по-вероятно биха имали имунни последици при мъжете в сравнение с жените (Abramowitz LK et al., 2014). Комбинираният ефект на хормоните, влияещи върху епигенетичната регулация на генната експресия и генния състав върху X-хромозомата, потенциално различаващ се между (XX) женски и (XY) мъжки, може да определи имунния отговор при ваксинация с HBV ваксината (Kovats S et al., 2010).

В литературата има данни за установен по-добър имуноен отговор при мъжете. Bagheri – Jamebozorgi M et al. (2014) публикуват проучване, проведено сред 300 лица в Иран, в което отбелязват, че anti-HBs Ab титърът е по-висок при мъжете в сравнение с жените, но разликите не са статистически значими ($p=0.17$). Не се установява значима разлика и между мъжете и жените ($n=840$) ($p= 0.20$) в проучване, проведено от Norouzirad R et al., (2014). Разликите в заключенията от различните изследвания по света по-скоро потвърждават, че образуването на антитела в отговор на ваксината срещу хепатит В зависи от множество фактори като вида, дозата и графика на ваксинирането, както и от възраст, пол, генетични фактори, съпътстваща заболяемост и състоянието на имунната система на ваксинирания (Hollinger FB, 2008).

5. ИЗВОДИ И ПРЕПОРЪКИ

Изводи

5.1. Разпространение на маркерите на HBV инфекция в обща популация в Североизточна България в периода 2011 – 2015 г.

1. Серологичните методи предлагат достоверна информация за разпространението на маркерите на HBV на популационно ниво.

2. Установена е трайна тенденция на спад в относителния дял на носителите на HBsAg в Североизточна България и специално при лицата под 20-годишна възраст, което потвърждава ефективността на ваксинационната програма срещу HBV в България.

3. Установихме недвусмислена връзка между пол, относителен дял HBsAg позитивност и разпространение на маркерите на HBV инфекция в обща популация. Мъжете са по-засегнатия пол от жените.

4. Според най-високия дял HBsAg и HBeAg позитивност заразяването с HBV започва в младежка възраст и е най-интензивно в средна възраст (30 – 59 г.), което е характерно за зоните с интермедиерна HBV ендемичност и потвърждава доминантно хоризонталния път на предаване на инфекцията с най-висок относителен дял носители на HBV маркери във възрастов диапазон 40 – 59 г.

5. Очертава се тенденция за обратна зависимост между повишен относителен дял носители на anti-HBc total и намален относителен дял HBsAg положителните лица на популационно ниво.

6. Според нашите данни anti-HBs Ab носителството в обща популация е по-високо при жените в сравнение с това при мъжете вероятно поради хормонални и имунни особености.

7. Маркери на HBV инфекцията регистрираме при 25.8% от изследваните за тях лица, като нашите данни са близки до тези от мащабно мултицентрово проучване в България. Това потвърждава тенденцията, дефинирана и от нас, за редуциране разпространението на HBV инфекцията в българската популация. Очакваме тенденцията да се запази и в бъдеще.

5.2. Етиологична връзка на HBV и HDV при пациенти с хронични чернодробни заболявания

1. Етиологичната връзка с HBV при пациентите с хронични чернодробни заболявания в Североизточна България според нашите данни е в 23.6%, показва тенденция за намаляване в сравнение с предходни проучвания и е в статистически значимо по-висок относителен дял при пациентите от мъжки пол.

2. HBeAg активност доказахме преимуществено при пациентите хронични чернодробни заболявания и HBV моноинфекция.

3. Едновременната HBV/HDV инфекция при пациентите с хронични чернодробни заболявания е с честота 16.6% в ELISA, показва повишаване в сравнение с предходни проучвания за региона, и при 96.9% от тях доказахме HDV RNA в Real-time PCR.

4. HBV/HDV коинфекция води до хронифициране в 8.3% от случаите според нашите данни, докато при суперинфекция хронифицирането е в 91.7% от случаите.

5. Нивата на HBV ДНК и HDV РНК при пациентите с хронични чернодробни заболявания показват средна по сила обратна корелация ($r_s = -0.34$, $p = 0.1$, $p > 0.05$). По-високи HDV нива с по-ниска HBV виремия доказахме в 50% от пациентите.

6. Не установихме зависимост между ензимните активности (ALT, AST и AP), хистологичния стадий на чернодробното заболяване, наличието на цироза, стадия на цирозата (по Чайлд), количествените нива на HBV DNA и HDV RNA в корелационен анализ.

7. Установихме умерена корелационна връзка между повишеното ниво на γ -GT, стадия на цироза и нивото на HDV RNA.

8. Нашите данни потвърждават по-тежкото увреждане на черния дроб при двойна и тройна инфекция, като повече от 60% от пациентите още в стадий на установяване на болестта са с чернодробна цироза.

9. Лечението с интерферонът (IFN) според нашите данни ефективно води до снижаване нивата на серумните трансминази и нивата на HDV RNA, но не води до трайно негативиране на HDV RNA, докато приложение на PEG-IFN води до вирусологичен отговор дори в случай на предишен неуспех на стандартната IFN терапия.

10. Нашите резултати категорично показват, че лечението с Lamivudine води до забележим спад в серумните нива на HBV DNA, но има слаб или няма ефект върху нивата на HDV RNA.

5.3. Дефиниране на относителния дял на окултно HBV носителство в Североизточна България

1. Определянето на anti-HBc total Ab е особено важна първа стъпка за дефиниране на OBI, въпреки че не е окончателна.

2. Златен стандарт и метод на избор при дефиниране на окултен хепатит В е Real-time PCR метода.

3. Значителният дял anti-HBc положителни лица в обща популация (8.6%), установен от нас в ELISA, вероятно е отражение на по-високата честота на разпространение на маркерите на HBV в популацията в Североизточна България, големия брой изследвани лица и по-високата средна възраст на изследваните.

4. Anti-HBc total Ab разпространението в ELISA е предимно в средна възраст и в двете групи изследвани лица, като при лицата от обща популация най-висок относителен дял констатирахме във възрастов диапазон 33 – 52 г., и при пациентите с хронични заболявания и чернодробна дисфункция – 41 – 50 г.

5. Лицата с доказана OBI в Real-time PCR са в по-високата средна възраст (54.8 г.), в която се очаква реактивация на латентната HBV инфекция. Според нас този факт трябва да насочва вниманието на клиничните лекари за проследяване на всички пациенти със серологични данни за скрита HBV инфекция в Real-time PCR за търсене на активация на инфекцията с напредване на възрастта.

6. Установихме, че по относителен дял anti-HBc total положителни резултати превалява мъжкия пол в сравнение с женския пол. Тези данни се потвърждават и от други автори.

7. Хипотетичният популационен риск за наличие и проява на окултен хепатит В при пациенти с хронични заболявания и данни за чернодробна дисфункция е по-висок от този при лица в обща популация (6.4% срещу 1.4%).

8. Нивата на чернодробните ензими не съответстват напълно на функционалното състояние на черния дроб и степента на неговото увреждане, но те се използват в рутинната практика, и трябва да насочват вниманието на специалистите за търсене на маркерите на хронична, остра или скрита инфекция с HBV и други хепатотропни вируси.

9. OBI е важен фактор не само в развитието и прогресията на хроничните чернодробни заболявания, но и поради възможността за предаване на инфекцията към реципиенти на кръв, кръвни продукти, тъкани и органи, както и за обратно негативно развитие при пациенти под имunosупресия.

10. Поради общи трансмисионни механизми за заразяване с HBV и HCV, при пациенти с хронична HCV инфекция е препоръчително да се търси OBI.

5.4. Проучване продължителността на имунния отговор при ваксинирани за HBV лица на възраст 6 м. – 20 г.

1. Нашите данни показват постваксинален имуен отговор при близо 80% от децата във възрастов диапазон 6 м. – 1 г. Получените резултати потвърждават ефективността на ваксината срещу хепатит В.

2. Постваксиналният имуен отговор се запазва в 67.7% от лицата до 15-годишна възраст и спада до 39.3% след тази възраст.

3. Според нашите данни около 60.7 % от ваксинираните лица след 15-годишна възраст нямат протективно антитяло ниво при неизвестен постимунизационен имуен отговор след първоначалната ваксинация.

4. Нашите резултати показват отчетливо по-добър постимунизационен имуен отговор при

жените в сравнение с мъжете ($p < 0.05$). В допълнение към хормоналните влияния, генетични и епигенетични фактори също допринасят за тези различия.

5. При проучването динамиката на антитяло отговора с възрастта според нас апликация на бустер доза ваксина би била полезна след 15-годишна възраст.

6. За определяне наличието на имунологичната памет е препоръчително последващо тестване нивото на anti-HBs Ab 1 месец след апликация на бустер дозата, особено при лица, на които предстои да работят с биологичен материал.

Препоръки

Въз основа на установеното от нас в дисертационния труд си позволяваме да направим следните препоръки:

1. HBeAg е важен маркер, дефиниращ активна вирусна репликация. Широко се използва в диагностиката на остра или активна хронична HBV инфекция. Обикновено не се прилага масово в скринингови проучвания, но корелира с високи нива на HBV DNA. За първи път е изследван в обща популация. Според нас активното изследване в по-млада възраст (30 – 39 г.) заедно с anti-HBe Ab ще дефинира по-точно началото на заразяване с HBV.

2. Окултният хепатит В е комплексно заболяване, което може да има различни клинични аспекти, включително да доведе до предаване на инфекцията при кръвопреливане или органна трансплантация, както и до реактивация при имуносупресирани пациенти. Препоръчваме въвеждане на теста за определяне на anti-HBc total при всички пациенти с данни за чернодробна дисфункция и на кандидатите за донори на органи, тъкани, кръв и кръвни продукти.

3. В бъдещи проучвания, свързани с ОБИ, както и при по-широко въвеждане на PCR метода в лабораторната вирусологична практика, HBV DNA трябва да се търси освен в серум/плазма и в периферни мононуклеарни клетки и в биопсичен материал от черен дроб с прилагане на високо чувствителни тестове.

4. HDV трябва да се определя количествено в Real-time PCR при пациентите с едновременна HBV/HDV хронична инфекция. Серологичният подход не позволява оценка на ефективността от прилаганото лечение.

5. При влошаване състоянието на пациенти с HBV инфекция трябва да се обсъжда смесена HBV/HDV инфекция, както и в случаите на негативиране на лабораторните маркери за HBV инфекция и рязко намаляване количеството на HBV DNA.

7. Предлагаме въвеждането на серологичното тестване на лицата за анти-HBs антителата 1 – 2 месеца след завършване на основната схема за ваксиниране заедно с други скринингови изследвания. Липсата на информация относно имунния отговор след първата имунизация прави трудна интерпретацията на неоткриваемото ниво на анти-HBs Ab години по-късно.

6. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. Направено е широкомащабно проучване върху разпространението на всички серологични маркери на HBV инфекцията в обща популация в Североизточна България.

2. Дефинирано е разпространението на HBeAg и anti-HBe Ab с изследване на голям брой лица от обща популация.

3. Установена е етиологичната връзка на HBV и HDV при пациенти с хронични чернодробни заболявания в Североизточна България с дефиниране на влиянието на възрастта и пола върху тяхната честота.

4. Дефинирано е взаимодействието между хепатотропните вируси HBV и HDV, както и влиянието на противовирусната терапия в Real-time PCR при пациенти с хронична HBV/HDV инфекция.

5. За първи път в страната е проведен скрининг за определяне носителството на изолирани anti-HBe total позитивни лица в обща популация и при пациенти с хронични заболявания и данни за чернодробна дисфункция.

6. Дефиниран е относителният дял на лицата с OBI в Real-time PCR в Североизточна България.

7. Проведено е сероепидемиологично проучване за дефиниране продължителността на поствакциналния имунитет при голям брой индивиди във възрастов диапазон 6 м. – 20 г., обхванати от задължителната ваксинационна програма срещу хепатит В.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е ролята на серологичните методи в диагностиката на HBV и HDV инфекциите.

2. Потвърдена е необходимостта от приложение на Real-time PCR, като златен стандарт при диагностициране на OBI, както и при оценка на ефективността от прилаганото лечение при пациенти с HBV и HDV ко/суперинфекция.

3. Потвърдена е тенденцията за редуциране разпространението на HBV инфекция в българската популация. Очакваме тенденцията да се запази и в бъдеще посредством изпълнение на имунизационната програма.

Приноси с приложен характер

1. Оценени са възможностите за приложение на различни методи и маркери в лабораторната и клинична практика по отношение на вирусните хепатити В и D.

2. Оценено е взаимодействието между двата вируса с цел по-коректна и точна диагностика на двойната HBV/HDV инфекция, което позволява адекватен подбор на терапевтични режими с цел удължаване живота на пациентите с този сериозен здравен и социален проблем.

7. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

7.1. Научни публикации, свързани с дисертационния труд

1. **D Tsaneva – Damyanova**, L Ivanova. Seroepidemiological investigation of hepatitis B virus core antibody (anti-HBc total) carriers in Northeastern Bulgaria. *Meditinski Pregled/Medical Review*, 2016, 52(5): 40 – 45.
2. **D Tsaneva – Damyanova**, Ivanova L, Ivanova I, Chervenkov T, Todorova T, Stoykova Z, Kostadinova T. Virological Responses Evaluated During Antiviral Therapy in Chronically Infected HBV and HDV Patients. *ACTA MICROBIOLOGICA BULGARICA*, 2017, 33(4): 157 – 166.
3. **D Tsaneva – Damyanova**, Golkocheva – Markova E, Ivanova L, Kostadinova T, Stoykova Z. Occult hepatitis B virus infection among patients with liver dysfunction in Varna, Bulgaria. *Journal of IMAB*, 2018, 24(4): 2196 – 2200.

7.2. Съобщения, иднесени на научни форуми

1. **Цанева – Дамянова Д**, Иванова Л. Относителен дял на HBsAg отрицателните носители на HBV в Североизточна България. XIII Национален Конгрес по Клинична Микробиология и Инфекции. София, България, 2015, Април 16 – 18.
2. **Tsaneva – Damyanova D**, Ivanova L. Occult hepatitis B virus infection among anti-HBc positive patients with clinical data of liver dysfunction. Fourth National Congress of Virology with International participation (Days of Virology in Bulgaria). Sofia, Bulgaria, 2016, May 18 – 20.
3. **Tsaneva – Damyanova D**, Ivanova L, Ivanova I, Stoykova Z, Kostadinova T, Chervenkov T. Virological responses evaluated during antiviral therapy in chronically infected HBV and HDV patients. *Microbiologica Balkanica*, 10th Balkan Congress of Microbiology. Sofia, Bulgaria, 2017, November 16 – 18.
4. **Tsaneva – Damyanova D**, Ivanova L, Stoikova Z, Kostadinova T. Evaluation of anti-HBs immune response in vaccinated children and adults in Northeastern Bulgaria. 9th South East European Conference on Chemotherapy, Infection and Cancer. Sarajevo, 2018, October.
5. Kostadinova T, Ivanova L, **Tsaneva – Damyanova D**, Stoikova Z. HBV and HCV incidence among non-Hodgking's lymphoma patients in Varna region (2013 – 2016). 14th Balkan Congress of Microbiology, Hisarya, Bulgaria, 2018, October 10 – 13.

8. УЧАСТИЕ В ПРОЕКТИ

„Проучване и анализ на циркулиращите в североизточна България HDV генотипове“, договор с рег.№ ФМН – 46/18.12.2017.

ИЗКАЗВАМ ЛИЧНАТА СИ И НАЙ-ИСКРЕНА БЛАГОДАРНОСТ

- ❖ На научният ми ръководител доц. д-р Лилия Иванова за оказаната подкрепа и ценните съвети по време на изготвянето на дисертационния труд, изработването на пробите, както и за професионалното ми развитие като лекар вирусолог и асистент в Катедра „Микробиология и вирусология“ към МУ – Варна.
- ❖ На доц. д-р Ирина Иванова от Клиниката по гастроентерология към УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, за професионализма, ценните съвети и съдействие.
- ❖ На екипите на лаборатория по Клинична вирусология и Центъра по транслационна медицина и клетъчна терапия при УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна, за всеотдайната работа и оказаното съдействие.
- ❖ На д-р Светослав Тодоров – ръководител на СМДЛ „Статус“ – Варна, за подкрепата и вярата в мен.
- ❖ На колегите от НРЛ по хепатитни вируси към НЦЗПБ – София и по-специално д-р Тенчо Тенев и гл. ас. Елица Голкочева-Маркова за безценната помощ и пълно съдействие при изработването на пробите за окултен хепатит В.
- ❖ На гл. ас. Д-р Силвия Павлова и доц. Татина Тодорова за съдействието при статистическата обработка на изнесените данни.
- ❖ На колегите ми от Катедра „Микробиология и вирусология“ на МУ – Варна и СМДЛ „Статус“ за коректните взаимоотношения, доверието и получената подкрепа.
- ❖ На моите безценни учители в живота и в професионалния ми път доц. Цветан Цеков и д-р Флора Цекова.
- ❖ НА МОИТЕ РОДИТЕЛИ, МОЯ СЪПРУГ И МОЕТО ДЕТЕ ЗА БЕЗКРАЙНАТА ОБИЧ, ПОДКРЕПА И ТЪРПЕНИЕ.

БЛАГОДАРЯ ВИ!

